

Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II

Faculté des Sciences de Luminy
163, Avenue de Luminy
13288 Marseille Cedex 09

THESE DE DOCTORAT
Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie Coumes Florens

Le 9 septembre 2011

en vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée

Les modules de « détection/résistance » aux
antibiotiques peptidiques chez les Firmicutes

Jury

Mr Frédéric BARRAS	Professeur Université de la Méditerranée	Examineur
Mr François DENIZOT	Directeur de Recherche CNRS Marseille	Examineur
Mme Maryline FOGLINO	Maître de conférence Université de la Méditerranée	Directrice de Thèse
Mr Tarek MSADEK	Directeur de Recherche Institut Pasteur	Rapporteur
Mr Jacques HAIECH	Professeur Université de Strasbourg	Rapporteur
Mr. Romé VOULHOUX	Chargé de Recherche CNRS Marseille	Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier Tarek Msadek et Jacques Haiech d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir consacré une partie de leur temps, en tant que rapporteurs, à examiner ce travail.

Je remercie Frédéric Barras de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

Je tiens à remercier Maryline Foglino pour m'avoir accueillie au sein de son équipe depuis 2008 et pour l'aide intellectuelle et matérielle qu'elle m'a apportée, ainsi que pour sa relecture attentive de ce manuscrit.

Je remercie également Elsa Germain, ma co-thésarde, pour ses bons conseils de manips. J'espère que tu passeras une bonne fin de thèse et que la suite te réservera que de bonnes surprises.

Je tiens à remercier François Denizot pour tout ce qu'il m'a apporté durant toutes ces années. En particulier de m'avoir laissé prendre des initiatives, être autonome, tout en étant toujours à l'écoute de mes questions et de mes réflexions. Merci pour son soutien, pour la confiance sans borne qu'il m'a accordé. Je n'oublierais pas tous les bons moments partagés, toutes les discussions et de toutes les blagues quotidiennes. De la bioinformatique aux β -gal, en passant par les Western Blots, on en aura partagé des expériences !

Je tiens à remercier Annick Guiseppi pour son appui technique et pour avoir partagé ses multiples connaissances, ainsi que pour son soutien et sa bonne humeur.

Je remercie également Marc Chippaux pour ses bons conseils du mercredi matin et son regard de généticien sur bien des aspects de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à Celine Brochier-Armanet qui a réalisé la partie bioinformatique de cette thèse. Merci pour tout ce travail qui a fortement contribué à

l'acceptation de l'article central de cet thèse et également, pour m'avoir expliquer les rudiments de la bioinformatique et la démarche mise en œuvre lors de ce projet.

Je tiens également à remercier mon parrain de thèse, Vincent Mejean, de m'avoir soutenue au jour le jour, aussi bien scientifiquement que humainement.

Je remercie également Cécile Jourlin-Castelli, ma référente de monitorat, pour son soutien et sa présence lors de mes premiers pas dans l'arène des TP. Merci aussi pour ses nombreux conseils de manips et de pédagogie.

Je tiens également à remercier Eric Cascales pour son appui technique lors des expériences de co-immunoprécipitation et pour les autres conseils qu'il m'a prodigué tout au long de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à Emmanuelle Bouveret qui m'a fourni tout le matériel nécessaire aux expériences de double hybride.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de cette thèse dans les meilleures conditions.

Sommaire

<i><u>I) Résistance aux antibiotiques : problématique et dissémination</u></i>	<i>19</i>
A) <i>L'utilisation des antibiotiques et ses conséquences</i>	<i>19</i>
1) Dans le milieu médical	19
2) Dans le monde agricole	21
B) <i>Dissémination des résistances et Plasticité génomique des bactéries</i>	<i>23</i>
1) Mutation naturelle du génome	25
2) Les éléments génétiques mobiles	27
3) Les mécanismes de transfert d'ADN	31
<i><u>II) Les antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne</u></i>	<i>33</i>
A) <i>L'enveloppe bactérienne</i>	<i>33</i>
1) Composition et caractéristiques	33
a) La paroi bactérienne	33
b) La membrane plasmique	35
2) Synthèse du peptidoglycane	37
a) Formation du précurseur monomérique	39
b) Translocation du précurseur monomérique	41
c) Polymérisation du peptidoglycane	45
□ Les PBPs ou Penicillin Binding Proteins	45
□ Renouvellement des couches de la paroi	49
d) Régénération du translocateur lipidique	49
B) <i>Diversité des antibiotiques ciblant la paroi bactérienne</i>	<i>53</i>
1) Les antibiotiques non peptidiques	53
2) Les antibiotiques peptidiques à synthèse ribosomale	53
3) Les antibiotiques peptidiques à synthèse non ribosomale	58
C) <i>Diversité des modes d'action des antibiotiques ciblant la paroi bactérienne</i>	<i>62</i>
1) Perturbation de l'intégrité membranaire	62
2) Blocage de la synthèse de la paroi	67
a) Inhibition de la formation du précurseur monomérique	69
b) Inhibition des étapes tardives de la synthèse du peptidoglycane	71
□ Les β -lactames	71
□ Le lipide II, une cible privilégiée de nombreux antibiotiques	74
□ L'inhibition du recyclage de l'undécaprénylpyrophosphate	78
D) <i>Mécanismes et régulation de la résistance aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne</i>	<i>80</i>
1) Diversité des mécanismes de résistances	80
a) Ciblage direct de l'antibiotique	80
b) Modification de la cible de l'antibiotique	84
c) Diminution de la pénétration de l'antibiotique	86

d) Les systèmes actifs d'efflux d'antibiotiques	90
□ La diversité des pompes d'efflux bactériennes	90
□ Structure et fonctionnement des transporteurs ABC	94
□ Classification des transporteurs ABC	98
2) Les mécanismes de régulation des gènes codant pour les systèmes de résistance aux antibiotiques ciblant la paroi	102
a) Les « cell wall stress stimulon »	102
b) Les facteurs sigmas à fonction extracytoplasmique ou ECFs	107
c) les systèmes à deux composants	109
□ Fonctionnement	109
□ Caractéristique de la détection du signal	111
□ Exemple de phosphorelais impliqués dans la régulation de mécanisme de résistances aux antibiotiques ciblant l'enveloppe	117

III) La résistance à la bacitracine chez *B. subtilis* 119

A) <i>B. subtilis</i> et les Firmicutes	119
1) Le groupe des Firmicutes	119
2) <i>B. subtilis</i> , une bactérie « modèle »	119
B) <i>Bacitracine</i>	121
1) Biosynthèse	123
2) Mode d'action	123
C) <i>Résistance à la bacitracine chez B. subtilis</i>	125
1) L'UPP phosphatase BcrC	127
2) Le système BceRSAB	129
a) Proximité génétique et couplage fonctionnel	129
b) Fonctionnement et caractéristiques	131

Résultats 137

I) A New Highly Conserved Antibiotic Sensing/Resistance Pathway in Firmicutes Involves an ABC Transporter Interplaying with a Signal Transduction System 139

A) Contexte de l'article	139
B) Article	143
C) Conclusion Article	195
1) Les modules de détection/résistance aux antibiotiques	195
2) Les ABC transporteurs de la sous-famille IV et leur rôle fonctionnel	197

3) La boucle extracytoplasmique de la MSD de l'ABC transporteur : ses caractéristiques et son rôle fonctionnel.	199
---	-----

II) Interaction entre le senseur BceS et le transporteur ABC BceAB

A) Résultats	204
1) Double hybride	204
2) Co-immunoprécipitation BceS	210
B) Matériels et Méthodes	217
1) Souches bactériennes, plasmides et conditions de croissance	217
2) Techniques de biologie moléculaire et biochimie	219

Discussion Générale et Perspectives 227

1) Les modules de détection/résistance aux antibiotiques	229
2) Le fonctionnement du module BceRSAB	231
3) Les transporteurs des modules de détection/résistance sont-ils des importeurs ou des exporteurs ?	233
4) Rôle fonctionnel de la boucle extracytoplasmique de la MSD (translocateur ou perméase).	239
5) Les transporteurs ABC et leur spécificité	242
6) Spécificité au niveau de l'induction des modules	244

Références Bibliographiques 252

Introduction bibliographique

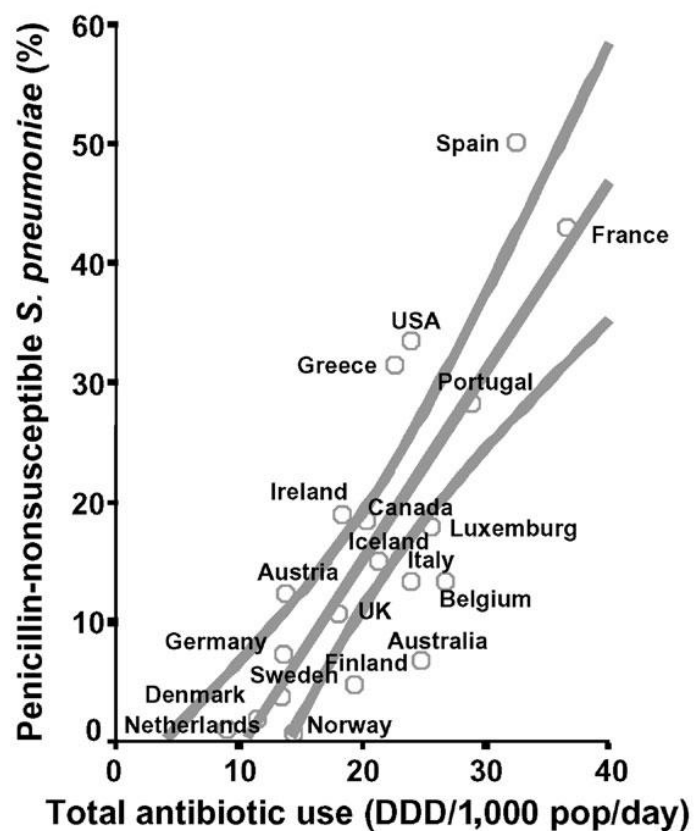


Fig.1 : Corrélation entre la consommation d'antibiotique et la prévalence de *Streptococcus Pneumoniae* résistants à la pénicilline dans vingt pays industrialisés. La consommation d'antibiotique est exprimée en dose journalière pour 1000 habitants. D'après (Albrich et al., 2004).

I) Résistance aux antibiotiques : problématique et dissémination

A) L'utilisation des antibiotiques et ses conséquences

Aujourd'hui, la surconsommation et la mauvaise utilisation des antibiotiques préoccupent l'ensemble de la planète. En 1997, plus de 10 000 tonnes d'antibiotiques ont été utilisées en Europe : 52% pour un usage médical et 48% pour un usage vétérinaire dont 33% en médecine vétérinaire et 15% comme facteur croissance.

1) Dans le milieu médical

En thérapie humaine, les statistiques indiquent que, dans environ 40% des cas, les traitements antibiotiques ne sont pas utiles et que souvent, les patients ne respectent pas leur traitement, ce qui peut entraîner une augmentation du risque de résistance aux antibiotiques (Pechère et al., 2007). De plus, deux-tiers des antibiotiques sont vendus sans ordonnance. Même en Europe, où la dispensation des antibiotiques est soumise à un contrôle, les patients s'automédiquent en utilisant très souvent des doses trop faibles ou/et des durées de traitement trop courts (Grigoryan et al., 2007).

On note une forte corrélation entre l'utilisation des antibiotiques et l'émergence de résistance à ces mêmes antibiotiques (Goossens, 2009). La figure 1 montre l'impact de la consommation d'antibiotiques sur le pourcentage de *Streptococcus pneumoniae* résistants à la pénicilline. Il apparaît que les pays ayant une consommation élevée d'antibiotiques connaissent une plus forte émergence de bactéries résistantes.

L'émergence de bactéries résistantes est très variable selon le contexte environnemental. A l'échelle d'un hôpital, une souche bactérienne résistante peut être deux fois plus présente dans une unité de soins intensifs que dans une autre unité (Archibald et al., 1997). A l'échelle d'un continent comme l'Europe, l'apparition des isolats de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) est plus fréquente dans les pays du sud de l'Europe que dans les pays du Nord. Troisième cause de maladies nosocomiales en Europe, ces bactéries sont un bel exemple de dispersion d'une souche résistante à travers le monde. En effet, la dispersion des SARM s'est faite dans le monde entier durant les vingt dernières années jusqu'à revêtir un

caractère endémique dans certains hôpitaux(Goettsch et al., 2000).

Si une disparité dans le phénomène d'émergence de bactéries résistantes est observée en fonction des différentes régions du globe, on peut noter une tendance globale à l'apparition de nouvelles souches résistantes ou multi-résistantes. Par exemple, aux Etats-Unis, on constate que l'augmentation de l'apparition des SARM est similaire quelque soit le lieu géographique ou l'unité hospitalière(Styers et al., 2006). La majorité de ces bactéries sont résistantes à au moins trois antibiotiques, mais encore sensibles à la vancomycine. Les Entérocoques quant à eux sont largement résistant à la vancomycine et montrent une grande capacité à acquérir de nouvelles résistances, comme au chloramphénicol, à la tétracycline, à l'érythromycine, à la rifampicine ou encore à la bacitracine(Linden and Miller, 1999). Ces Entérocoques multi-résistants sont aujourd'hui une des premières causes des maladies nosocomiales dans le Monde.

2) Dans le monde agricole

Au niveau de l'industrie agroalimentaire, les antibiotiques sont également utilisés en masse. Dans les élevages, ils ont en premier lieu un rôle thérapeutique (traitement d'une infection bactérienne) ou prophylactiques (prévention d'une infection possible). Depuis les années 50, les antibiotiques sont également utilisés dans l'industrie alimentaire comme facteur de croissance sous forme d'additif alimentaire. En effet, l'incorporation d'antibiotique dans l'alimentation des animaux engendre un gain de poids de 2 à 5%.

Cependant, la présence constante d'antibiotiques exerce une pression de sélection sur la flore microbienne naturelle et sur les agents pathogènes présents chez ces animaux, favorisant ainsi le développement d'une flore résistante. C'est ainsi que l'on a pu détecter, dès 1960, la présence de bactéries résistantes dans les élevages et qu'aux Etats-Unis, en 1984, dix huit personnes, dans quatre états différents, ont été infectées par des souches de *Salmonella* résistantes provenant de différents élevages(Holmberg et al., 1984). Le meilleur exemple des conséquences de l'utilisation des antibiotiques comme facteur de croissance est celui de l'avoparicine. Il a été montré que cet antibiotique, utilisé comme additif alimentaire depuis une vingtaine d'années, favorisait l'apparition d'entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) dans les élevages(Bager et al., 1997).

L'agriculture, enfin, utilise des micro-organismes non-pathogènes comme bio-pesticides. C'est le cas de *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis* ou encore *Paenibacillus popilliae*.

Cette dernière bactérie a été employée, entre autre, pour combattre les insectes de type coléoptères au Japon et présente un niveau élevé de résistance à la vancomycine. Les gènes de résistance à la vancomycine de *P. popillae* semblent être à l'origine des gènes trouvés chez les *Enterococci* et vont alors conférer le même type de résistance à ces pathogènes (Patel et al., 2000).

En 2006, l'Union européenne a interdit l'usage d'antibiotiques comme facteur de croissance, mais ils sont toujours utilisés dans d'autres parties du monde (Etats-Unis, Canada, Australie, Chine).

B) Dissémination des résistances et Plasticité génomique des bactéries

Il existe deux types de résistances aux antibiotiques : les résistances innées ou naturelles et les résistances acquises.

Les antibiotiques étant produits majoritairement par des bactéries, ces dernières possèdent donc des systèmes de résistances à ces antibiotiques : ce sont les résistantes dites naturelles qui confèrent une immunité contre les antibiotiques qu'elles produisent. Par ailleurs, certaines bactéries sont capables de résister naturellement à certains antibiotiques grâce à leur morphologie : les bactéries à Gram négatif sont résistantes à plusieurs antibiotiques grâce à l'imperméabilité importante que leur confère la présence de deux membranes

Les résistances acquises sont à la base de la compréhension de la dissémination des résistances dans des espèces bactériennes différentes. Elles apparaissent grâce à la grande plasticité des génomes bactériens et à l'adaptation rapide des bactéries à de nouvelles conditions dans leur milieu. Plusieurs études mettent clairement en évidence ces disséminations à travers plusieurs espèces et écosystèmes différents. Par exemple, la résistance à la vancomycine, un antibiotique peptidique ciblant la paroi bactérienne, semble avoir été transmise aux Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) à partir des bactéries du sol productrices de cet antibiotique (*Streptomyces toyocaensis* et *Amycolatopsis orientali*). En effet, les déterminants génétiques codant pour cette résistance chez les ERV sont très similaires à ceux retrouvés chez les bactéries productrices (Marshall et al., 1998). Par ailleurs, ces gènes pourraient également provenir de *P. popillae*, comme cité ci dessus (Patel et al., 2000). De plus, il a été montré que l'utilisation excessive d'ampicilline a probablement

entraîné la dissémination des gènes de résistance à cet antibiotique à partir d'*Escherichia coli* jusqu'aux pathogènes *Gonococci* et *Haemophilus influenzae*(Jacoby and Archer, 1991).

La plasticité génomique chez les microorganismes est permise par différents mécanismes moléculaires permettant une dynamique importante de leur génome.

1) Mutation naturelle du génome

Il a été établi que les génomes bactériens possèdent une fréquence élevée de mutation. En effet, lorsque l'ADN bactérien se réplique, des substitutions de bases peuvent avoir lieu avec une fréquence estimée à 10^{-9} par paire de bases répliquée(Bridges, 2001). Cette fréquence de mutation permet l'apport de nouveaux déterminants génétiques de résistance comme une modification de la cible de l'antibiotique, une augmentation de l'expression des systèmes d'efflux de l'antibiotique ou encore une modification de certaines voies métaboliques cibles. Ainsi, les bactéries peuvent s'adapter rapidement à la présence de l'antibiotique dans leur milieu et mettre en place un système de résistance à cet antibiotique. Il a été montré que les souches bactériennes résistantes aux fluoroquinolones possédaient souvent des mutations ponctuelles au niveau de la cible de ces antibiotiques. Les fluoroquinolones vont interagir avec l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, inhibant ainsi la réplication de l'ADN bactérien et son surenroulement(Gellert et al., 1977; Peng and Mariani, 1993). La résistance à ces antibiotiques est corrélée à des mutations au niveau d'une région appelée Quinolone Resistance Determinant Region ou QRDR des gènes *gyrA* et *parC*, codant respectivement pour une sous-unité de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV(Piddock, 1999). Chez *Campylobacter jejuni*, une seule mutation dans la région QRDR de *gyrA* permet un haut niveau de résistance à l'enrofloxacin, appartenant à la famille des fluoroquinolones(Payot et al., 2002).

De plus, les bactéries en réponse au stress peuvent entrer dans un état d'hypermutation de leur génome. Ce mécanisme, appelé réponse SOS, implique des ADN polymérases alternatives et moins fidèles(Friedberg et al., 1995). Cet état d'hypermutation va favoriser l'apparition de variants résistants(Bridges, 2001). Certains antibiotiques comme les fluoroquinolones induisent cette réponse SOS et l'entrée en phase d'hypermutation chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*(Beaber et al., 2004; Ysern et al., 1990). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie pathogène opportuniste Gram négative, l'entrée en phase

d'hypermutation est due aux nombreux stress que la bactérie subit au cours de l'infection qu'elle provoque et en particulier la réponse immunitaire de l'hôte et la présence de différents antibiotiques utilisés durant le traitement de cette infection. 36% des patients subissant une infection chronique à *P. aeruginosa* sont colonisés par une souche hypermutable et les phénotypes d'hypermutation sont directement corrélés avec les résistances multiples aux antibiotiques(Oliver et al., 2000).

2) Les éléments génétiques mobiles

Les bactéries possèdent de nombreux éléments génétiques mobiles dans leur génome, dont certains contiennent des déterminants de résistance aux antibiotiques. De plus, chez les bactéries à Gram positif, ces éléments mobiles peuvent contenir de nombreux déterminants de résistances différents. On parle alors d'un phénomène de « Bundling » (packaging ou empaquettement)(Rice, 2000). Ce phénomène favorise la dissémination de résistance par transferts horizontaux.

Les transferts de résistances dus aux plasmides autotransférables se rencontrent majoritairement chez les bactéries à Gram positif : ces plasmides sont, par exemple, responsables de l'acquisition de résistance à la gentamycine et aux β -lactames chez *E. faecalis*(Rice and Murray, 1995) et de résistances à la gentamycine et à la mupirocine chez les *Staphylococci*(Udo and Jacob, 1998). La prédiction de certaines résistances aux antibiotiques peut être établie par l'identification de ces plasmides. En effet, les déterminants de résistance à la gentamycine et aux β -lactames sont souvent codés par le même plasmide chez *Enterococcus faecalis* : un isolat résistant aux β -lactames est également souvent résistant à la gentamycine. Les plasmides autotransférables à spectre large ont, quant à eux, la capacité à être transférés à plusieurs espèces bactériennes différentes. Par exemple, le plasmide TEM-1, portant une résistance aux β -lactames, s'est répandu très largement dans 60% des Entérobactéries et dans quelques souches de *P. aeruginosa* et *H. influenzae*(Livermore, 1995).

Les transposons sont de petits segments d'ADN capables de se déplacer et de se multiplier de manière autonome dans le génome. Le phénomène de transposition peut avoir lieu de deux manière différentes : la transposition conservatrice entraîne le transfert d'une séquence d'ADN d'un site à un autre, tandis que la transposition répllicative entraîne le transfert de l'élément transposable d'un site à l'autre, tout en conservant une copie de la

séquence d'ADN au site originel. Tous les transposons contiennent l'information nécessaire à leur transposition, c'est à dire, dans le cas le plus simple, un gène codant pour une transposase flanqué de part et d'autre de séquences inversées répétées. La transposase coupe et referme l'ADN au niveau de courtes séquences qu'elle reconnaît comme étant des sites de recombinaison spécifiques entre le transposon et le chromosome. Ces sites sont toujours composés de séquences directes répétées spécifiques de leurs transposases. Les transposons complexes peuvent porter des gènes sans lien avec la transposition, comme des gènes de résistance aux antibiotiques. Ces transposons sont très répandus chez les bactéries à Gram positif et constituent l'exemple type du phénomène de « Bundling ». Chez *E. faecalis*, le transposon Tn5385 est un élément génétique d'environ 65 kilo-paires de bases codant pour plusieurs résistances aux antibiotiques : streptomycine, tétracycline, gentamycine, érythromycine, β -lactames; ainsi que pour la résistance au mercure chlorhydrique. Cet élément mobile est en fait un regroupement de plusieurs transposons(Rice, 2000).

Les intégrons sont des éléments génétiques constituant un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Ces cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés d'un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique de site, effectué par une intégrase. Les intégrons ont surtout été étudiés chez les bactéries à Gram négatif mais ont aussi été mis en évidence chez les bactéries à Gram positif (Corynebactéries, Entérocoques). Les intégrons jouent un rôle important dans la dissémination des déterminant génétiques de résistance aux antibiotiques, par exemple lors de la dissémination des résistances aux sulfamides et à la streptomycine(Hall, 1997). Récemment, on a découvert chez *Vibrio cholerae* des “superintégrons” portant une centaine de cassettes codant, entre autres, pour différentes résistances aux antibiotiques(Rowe-Magnus et al., 1999).

L'identification de ces différents éléments mobiles chez les bactéries a permis d'observer que les déterminants génétiques de résistances aux antibiotiques sont souvent concentrés et donc facilement transférables en bloc. De plus, tous ces éléments génétiques mobiles peuvent « s'entremêler » : un transposon peut se transposer dans un chromosome, un plasmide, un intégron ou encore, dans un autre transposon. Par ailleurs, les bactéries sont capables d'accepter de l'ADN étranger dans leur génome indépendamment ou non de ces éléments mobiles.

3) Les mécanismes de transfert d'ADN

La dissémination des éléments mobiles ou de mutations a lieu *via* différents mécanismes de transfert d'ADN.

La transduction, mécanisme de transfert d'ADN médié par les bactériophages, a été proposée comme étant à l'origine de la dissémination rapide des résistances aux β -lactames chez les Staphylocoques. La plupart des plasmides codant pour la production de β -lactamases font en effet 35 à 40 kilo-paire de bases, ce qui correspond à la taille moyenne des génomes de bactériophages (Lyon and Skurray, 1987).

La transformation, capture d'ADN présent dans le milieu extérieur par la bactérie, est supposée être à l'origine de la résistance à la pénicilline chez *S. pneumoniae* (Dowson et al., 1989). Si peu de bactéries ont la capacité d'être naturellement compétentes pour ce mécanisme de transfert d'ADN, certaines espèces sont dites à hautes fréquences de transformation : c'est le cas des espèces du genre *Bacillus* ou *Streptomyces*, qui peuvent intégrer ou relâcher une grande quantité d'ADN. Cet ADN relâché dans l'environnement peut résister aux DNases durant plusieurs mois (Lorenz and Wackernagel, 1994).

La conjugaison, transfert de molécules d'ADN entre deux bactéries en contact direct, peut concerner des plasmides (appelés conjuguatifs), des transposons ou des segments d'ADN chromosomique. Les transferts par conjugaison peuvent être à spectre très large. Par exemple, le transposon conjugatif Tn916 peut se propager dans 50 espèces bactériennes différentes, réparties sur 24 genres différents (Clewett et al., 1995; Salyers and Shoemaker, 1996).

La grande plasticité génomique de leur génome permet aux bactéries d'échanger des déterminants génétiques de résistance aux antibiotiques. Ces échanges se produisent au niveau des niches écologiques dans lesquelles cohabitent de nombreuses espèces de bactéries, facilitant ainsi les disséminations inter-espèces.

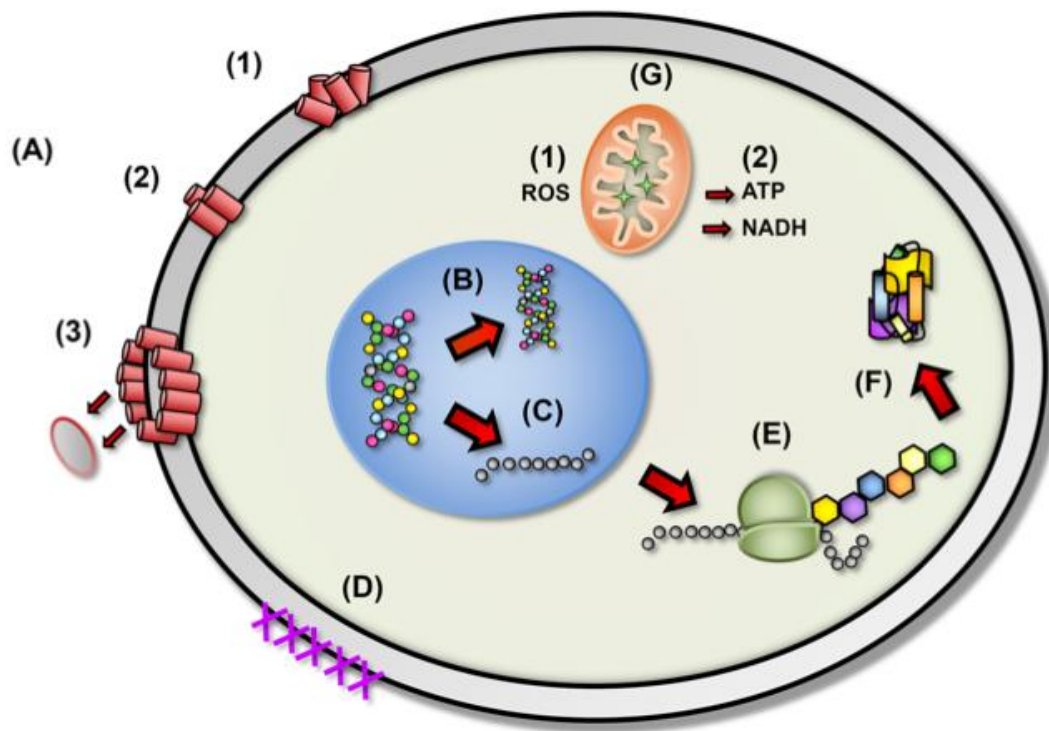


Fig.2 : Les différents modes d'action des antibiotiques sur les cellules microbiennes, d'après (Peters et al., 2010).

(A) Perturbation de l'intégrité membranaire : (1) insertion dans la membrane, (2) alignement des séquences hydrophobes, (3) formation de pores.

(B) Inhibition de la synthèse de l'ADN.

(C) Inhibition de la synthèse de l'ARN.

(D) Blocage de la synthèse de la paroi bactérienne.

(E) Inhibition des fonctions ribosomiques et de la synthèse protéique.

(F) Blocage des protéines chaperonnes nécessaires au repliement adéquat des protéines.

(G) Ciblage de la mitochondrie : (1) Blocage de la respiration cellulaire et induction de la formation de dérivés réactifs de l'oxygène, (2) perturbation de l'intégrité membranaire de la paroi de la mitochondrie et de l'efflux de l'ATP et du NADH.

II) Les antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne

Les antibiotiques agissent sur les mécanismes essentiels à la vie de la bactérie : réplication, transcription, synthèse protéique, métabolisme intracellulaire et maintien de l'intégrité membranaire (Fig.2).

Au cours de ma thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne, comme, par exemple, la bacitracine.

A) L'enveloppe bactérienne

1) Composition et caractéristiques

L'enveloppe bactérienne est une structure entourant et protégeant le cytoplasme de la bactérie. La composition de cette enveloppe différencie les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif (Fig.3). Les deux types d'enveloppe bactérienne sont constitués d'une membrane plasmique interne à laquelle est associée une paroi cellulaire. Dans le cas des bactéries à Gram négatif cette dernière est constituée de quelques couches de peptidoglycane puis d'une membrane externe. Par contre la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est constituée uniquement d'une épaisse couche de peptidoglycane qui forme une structure homogène et rigide restant cependant perméable aux petites molécules. Dans le cas des bactéries à Gram négatif c'est la membrane externe supplémentaire qui renforce l'imperméabilité de la cellule à de nombreuses drogues et antibiotiques.

a) La paroi bactérienne

C'est une structure semi-rigide complexe conférant forme et rigidité à la cellule et protégeant la membrane plasmique. Elle est composée d'un réseau macromoléculaire, le peptidoglycane ou muréine. Le peptidoglycane est constitué d'une répétition d'un disaccharide, formant des chaînes reliées entre elles par des polypeptides (Fig.4). Cet assemblage en treillis enveloppe toute la cellule et lui confère une résistance suffisante pour contrer la forte pression osmotique intracellulaire. Ainsi, l'absence de paroi provoque rapidement une lyse de la cellule. La mobilité bactérienne nécessite également la présence de cette paroi. En effet, les structures flagellaires permettant cette mobilité ont besoin d'exercer

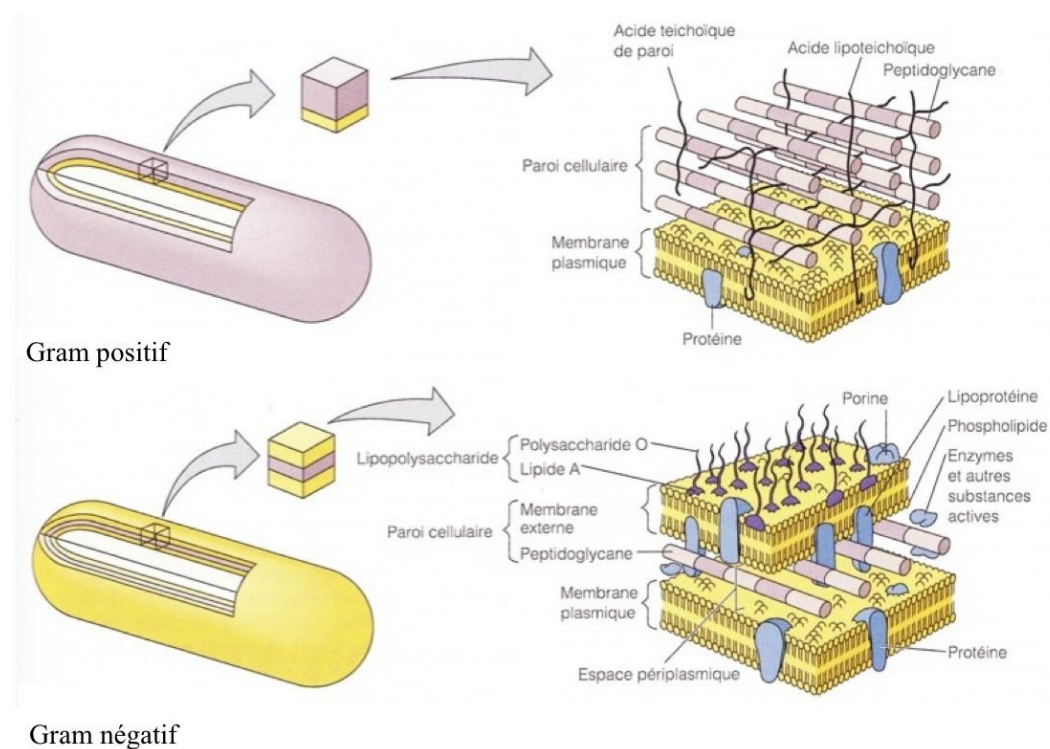


Fig.3: Enveloppe bactérienne des bactéries à Gram positif et négatif.

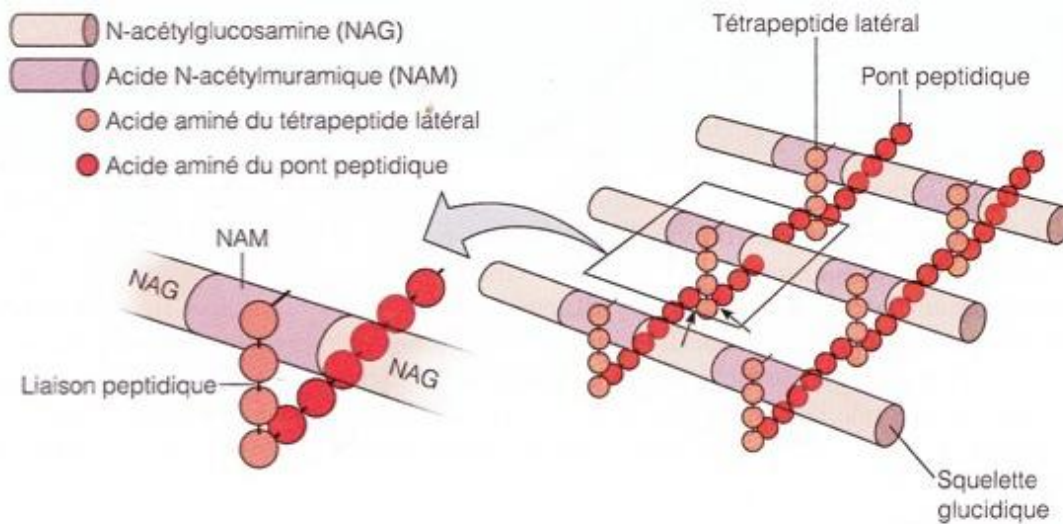


Fig.4 : Structure du peptidoglycane chez une bactérie à Gram positif.

Le squelette glucidique (partie glycanne de la molécule) et le tétrapeptide latéral (partie peptidique) forment le peptidoglycane. La fréquence des ponts peptidiques et le nombre d'acides aminés qu'ils contiennent varient selon les espèces bactériennes. Les petites flèches indiquent les liaisons qui se forment normalement entre les rangées de peptidoglycane et les ponts peptidiques, et dont la pénicilline empêche la formation.

une force sur une surface solide afin de permettre le mouvement. La paroi joue également un rôle important lors de la division cellulaire ou de la sporulation, essentiellement chez les bactéries à Gram positif. Chez ces dernières, la formation du septum de division, et donc la séparation finale des deux cellules filles, se fait par synthèse de peptidoglycane. D'autre part, l'étape de confinement de la spore naissante ou «engulfment » est également dépendante d'une synthèse accrue de peptidoglycane.

De nombreuses autres molécules sont présentes dans la paroi (Fig.4). Chez les bactéries à Gram négatif, on trouve essentiellement une molécule lipoprotéique nommée lipoprotéine de Braun. Cette protéine a un rôle structural car elle relie la mince couche de peptidoglycane à la membrane externe maintenant ainsi un espace constant entre ces deux structures. Elle contribue donc à la stabilité et à la rigidité de l'enveloppe(Braun, 1975). Chez les bactéries à Gram positif, on trouve d'autres polymères dans la paroi, comme les acides téichoïques, teichuroniques et lipotéichoïques. Les acides téichoïques sont formés d'un alcool (le glycérol ou le ribitol) et de phosphate et se fixent à la couche de peptidoglycane *via* les résidus N-acétylmuramique de celui-ci. Les acides teichuroniques sont également constitués de glycérol ou ribitol mais connecté par de l'acide uronique. Les acides téichoïques et teichuroniques jouent un rôle dans la croissance de la cellule en empêchant la détérioration massive de la paroi et lui confèrent la majeure partie de sa spécificité antigénique. Les acides lipotéichoïques, enfin, sont aussi très similaires aux acides téichoïques mis à part qu'une de leur extrémité possède un acide gras qui permet d'ancrer la molécule au niveau de la membrane plasmique. Ceci augmente la stabilité et le maintien du peptidoglycane autour de la membrane plasmique.

b) La membrane plasmique

La membrane interne est composée d'une bicouche de phospholipides et contient diverses protéines. Cette membrane est hydrophobe, fluide et fonctionne comme une barrière qui empêche la fuite des constituants hydrophiles cytoplasmiques. Elle est également à la base de tous les échanges s'effectuant entre la bactérie et son milieu extérieur (Fig.4).

Les phospholipides et les protéines constituant la bicouche ne sont pas immobiles mais se déplacent librement dans le plan de la membrane. Chez *B. subtilis*, parmi les phospholipides on trouve majoritairement les phosphatidyléthanolamines (PE) et les phosphatidylglycérols (PG) qui représentent à eux deux 65 % des phospholipides

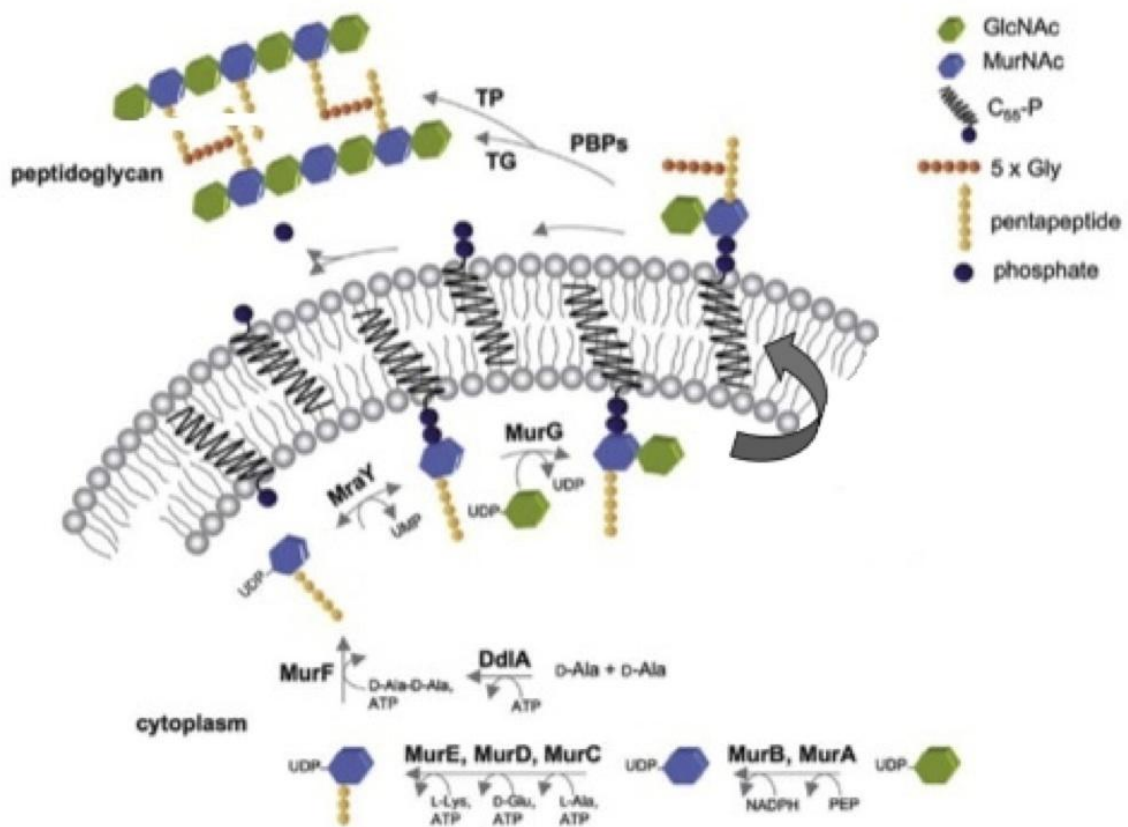


Fig.5 : Représentation schématique de la biosynthèse de la paroi cellulaire.

La synthèse débute dans le cytoplasme par la conversion de l'UDP-N- acétylglucosamine (UDP- GlcNAc) en UDP-NAM-pentapeptide (UDP-MurNAc) catalysée par l'action séquentielle des enzymes MurA-F. La formation du dipeptide D-ala-D-ala ajouté à l'extrémité du pentapeptide est réalisée par DdlA, qui procède à la dimérisation de ces deux résidus. Le lipide I est ensuite formé sur la face interne de la membrane grâce à l'action de l'enzyme MraY, qui va lier le UDP-MurNAc-pentapeptide à l'Undecaprénol-Phosphate ou transporteur lipidique (C₅₅-P). Puis, la translocase MurG lie une molécule d'UDP-N-acétylglucosamine (UDP- GlcNAc) au lipide I, générant ainsi le lipide II (UPP-MurNAc- GlcNAc – pentapeptide). Le lipide II est alors transloqué à travers la membrane par un mécanisme inconnu. Du côté externe de la membrane, les monomères de peptidoglycane sont incorporés dans le réseau de peptidoglycane grâce à l'action des PBPs (Penicillin Binding Proteins) par des réactions de transglycosylation (TG) et de transpeptidation (TP). D'après (Schneider and Sahl, 2010).

membranaires. La proportion restante correspond à des cardiolipines et à une forme estérifiée de PG(Mendoza et al., 2002).

Les protéines de la membrane peuvent être disposées de différentes façons. Les protéines périphériques sont situées à la surface interne ou externe de la membrane et peuvent jouer un rôle d'enzymes, de molécules structurales ou encore modifier la forme de la membrane lors des mouvements de la cellule. Les protéines intrinsèques s'enfoncent dans la bicouche de phospholipides et portent le nom de protéines transmembranaires. C'est le cas des protéines de détection des conditions du milieu extérieur (senseurs), dont nous parlerons plus en détails, et des protéines de transports intervenant dans l'obtention de nutriments essentiels.

Une des caractéristiques importantes de la membrane cytoplasmique est qu'elle est imperméable aux protons. Cette propriété est utilisée par la bactérie afin d'énergiser la membrane. Ainsi, les systèmes enzymatiques nécessaires à la transmission d'énergie et à la phosphorylation oxydative sont retrouvés dans la membrane. Ces enzymes permettent à la bactérie de synthétiser l'ATP, molécule énergétique indispensable à de nombreux transports et activités enzymatiques.

Contrairement aux membranes plasmiques des cellules eucaryotes qui sont neutres, les membranes plasmiques bactériennes ont la caractéristique de présenter à leur surface une charge nette négative due aux divers groupements phosphates des phospholipides anioniques. Cette propriété est largement utilisée par de nombreux antibiotiques ciblant spécifiquement ces membranes bactériennes.

2) Synthèse du peptidoglycane

Le mécanisme de synthèse du peptidoglycane est conservé dans l'ensemble des bactéries mais n'est pas retrouvé chez les autres organismes. Ces caractéristiques ainsi que le rôle important du peptidoglycane chez les bactéries en font une cible majeure pour les antibiotiques(Koch, 2003).

Les précurseurs monomériques de peptidoglycane sont synthétisés dans le cytoplasme bactérien puis transloqués au travers de la membrane plasmique afin de renouveler constamment le peptidoglycane préexistant. Les couches naissantes sont donc proches de la membrane cytoplasmique et les anciennes couches font face au milieu extracellulaire. Chez *B. subtilis*, la synthèse de peptidoglycane se fait de manière hélicoïdale(Leaver and Errington,

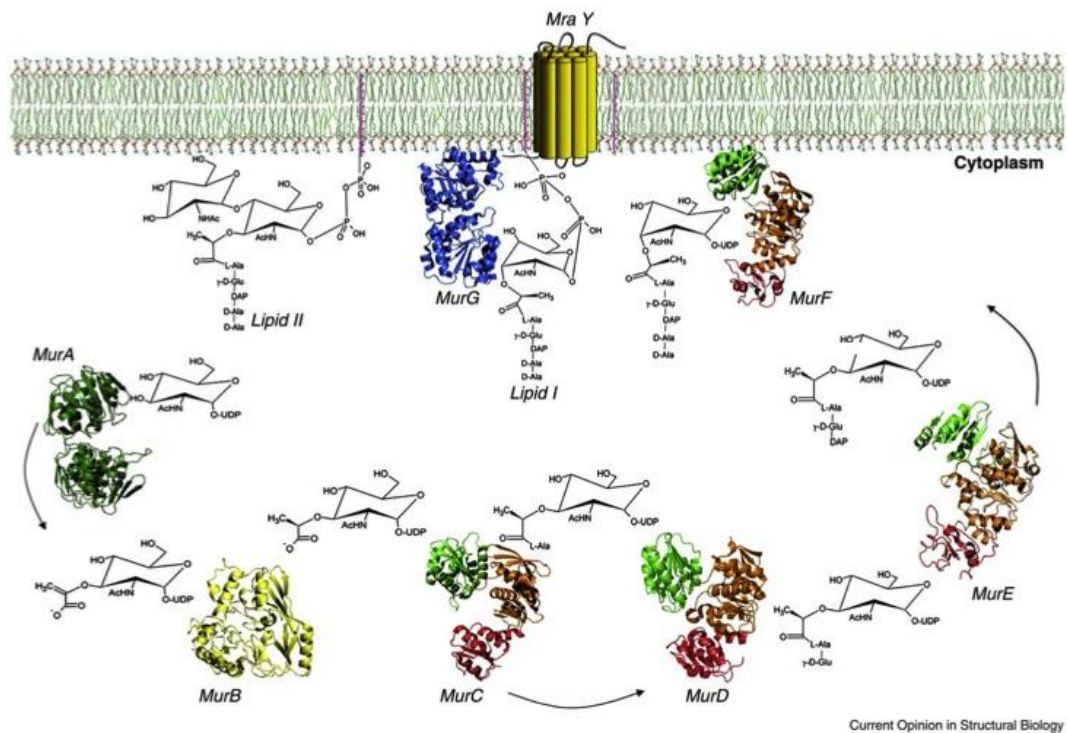


Fig.6 : Les étapes cytoplasmiques de la biosynthèse du peptidoglycane.

La biosynthèse du peptidoglycane implique les enzymes Mur A-G, ainsi que la protéine transmembranaire *MraY*. Les différents domaines des ligases Mur sont indiqués en couleurs distinctes (domaine N-ter : rouge, domaine de liaison à l'ATP : orange, domaine C-ter : vert). L'undécaprénol phosphate ou translocateur lipidique est indiqué en rose. D'après (Mattei et al., 2010).

2005). Des auteurs sont parvenus à la suivre en utilisant notamment des antibiotiques peptidiques ciblant cette synthèse de paroi et marqués avec des fluorochromes(Tiyanont et al., 2006). Cette synthèse ordonnée du peptidoglycane détermine la forme de la bactérie (un bâtonnet dans le cas de *B. subtilis*).

On distingue plusieurs étapes dans cette synthèse de peptidoglycane suivant leur localisation cellulaire. Les étapes primaires permettent la synthèse du précurseur monomérique de peptidoglycane ; l'étape secondaire consiste en la translocation de ces monomères à travers la membrane plasmique vers l'espace périplasmique ; et les dernières étapes consistent en l'assemblage des précurseurs monomériques en polymères et des couches de peptidoglycane (Fig.5).

a) Formation du précurseur monomérique

La synthèse du précurseur du peptidoglycane implique plus de 10 réactions réalisées dans le compartiment cytoplasmique(Mattei et al., 2010).

Le processus débute par la formation d'UDP-N-acétylglucosamine (UDP- GlcNAc), auquel va être lié une molécule de phosphoenolpyruvate par l'action d'une énopyruvate transférase (MurA). Cette molécule est ensuite transformée en UDP-N-acide-acétylmuramique (UDP-NAM) grâce à l'enzyme MurB, une réductase. Une chaîne pentapeptidique est ensuite directement générée sur l'UDP-NAM *via* l'action consécutive des enzymes MurC, D, E, F appartenant à une famille d'acides aminées ligases ATP dépendantes (Fig.6). L'extrémité du pentapeptide est constituée de deux D-ala, qui sont ajoutées à la chaîne peptidique par une D-alanine ligase. Les Mur ligases possèdent une structure 3D similaire, avec un domaine N-terminal liant le précurseur UDP- NAM, un domaine central reconnaissant l'ATP et un domaine C-terminal reconnaissant les acides aminés ajoutés sur le précurseur(Barreteau et al., 2008).

La molécule ainsi formée, l'UDP-NAM-pentapeptide (UDP-MurNAc), est le substrat de la protéine intégrale de membrane MraY, qui va le lier au transporteur lipidique, undecaprényl-phosphate (UP), également appelé C₅₅-P. Comme nous le verrons, l'UP joue un rôle de translocateur essentiel dans le transport du précurseur du cytoplasme vers l'espace périplasmique. De cette fixation de l'UDP-NAM-pentapeptide à l'UP résulte une molécule à localisation subcellulaire, l'UPP-NAM-pentapeptide, ou lipide I, et où le translocateur lipidique est sous forme pyrophosphorylée (UPP pour Undécaprényl-PyroPhosphate).

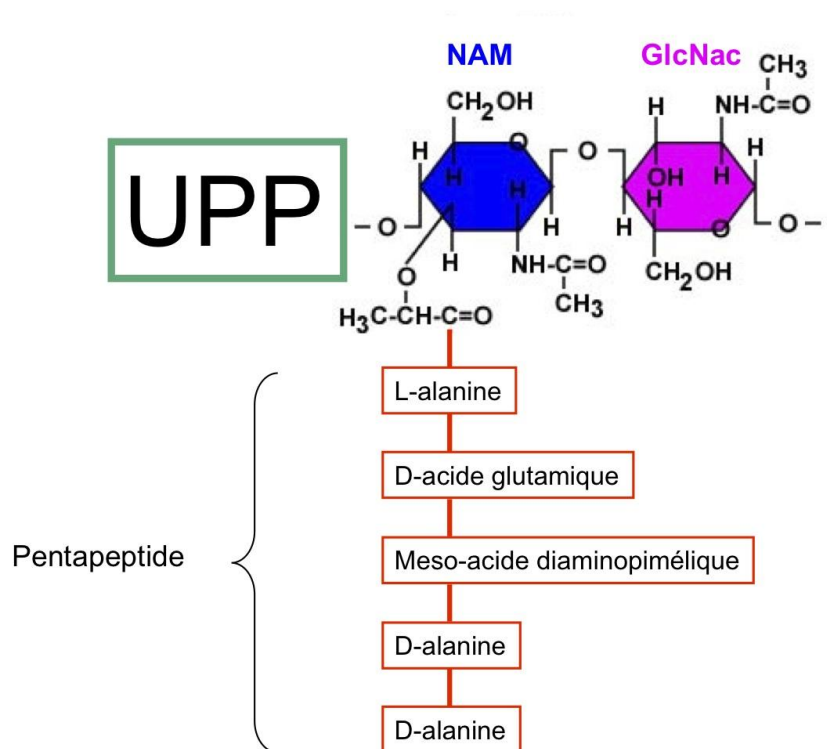


Fig.7 : Le précurseur de peptidoglycane (ou lipide II) chez *Bacillus subtilis*.

La dernière étape de formation du précurseur du côté cytoplasmique implique le transfert d'une molécule d'UDP-N-acétylglucosamine (UDP- GlcNAc) à l'UPP-NAM-pentapeptide, réalisé par la protéine MurG. La molécule UPP-MurNAc- GlcNAc-pentapeptide, ainsi générée, est appelée plus simplement lipide II (Fig.7) et constitue la dernière forme du précurseur associé à la membrane avant la translocation(Bouhss et al., 2008; Scheffers and Pinho, 2005).

b) Translocation du précurseur monomérique

Comme nous avons pu le voir, l'assemblage du lipide II est entièrement réalisé du côté cytoplasmique, alors que la polymérisation des monomères de peptidoglycane se déroule du côté externe de la membrane. Les enzymes catalysant l'assemblage du peptidoglycane ont en effet été localisées du côté externe chez *B. subtilis*(Harrington and Baddiley, 1983). Ainsi, une des étapes majeures de la synthèse du peptidoglycane consiste en la translocation du lipide II du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane et les mécanismes impliqués dans cette translocation sont peu connus.

Le lipide d'ancrage du précurseur, l'undécaprénylpyrophosphate (ou UPP), appartient à la famille des polyisoprénylphosphates. Ces molécules fortement hydrophobes sont constituées d'un assemblage de sous-unités isoprènes avec une extrémité hydrophile formée de deux groupements phosphates. Cette famille regroupe un grand nombre de molécules lipidiques qui se différencient par le nombre de sous-unités isoprènes qui les constituent et donc par la taille de leur chaîne carbonée. L'UPP, quant à lui, est constitué de 11 sous-unités isoprènes constituant une chaîne de 55 carbones ce qui a conduit à le nommer également C₅₅-Isoprénylpyrophosphate. L'enzyme catalysant la polymérisation finale de ces sous-unités en UPP a été caractérisée chez *E. coli* et se nomme UppS pour UPP synthase(Kato et al., 1999; Fujihashi et al., 2001). Les premières études biochimiques du comportement de ces lipides polyisoprènes dans la bicouche lipidique ne mettent pas en évidence leur possible capacité à se transloquer entre les deux feuillets de la membrane(McCloskey and Troy, 1980; Hanover and Lennarz, 1979). Cependant, les propriétés physiques de l'UPP et sa grande chaîne hydrophobe sont compatibles avec une translocation par diffusion passive du lipide. Le précurseur monomérique MurNAc- GlcNAc-pentapeptide fixé à l'UPP adopte une conformation compacte avec une surface fortement hydrophobe, ce qui pourrait faciliter la diffusion passive du lipide II entre les feuillets membranaires. Cette hypothèse de diffusion

passive est fortement contestée par le rendement important nécessaire à la cellule pour renouveler constamment son peptidoglycane. De plus, il a été récemment établi, par des expériences de fluorescence, que le lipide II est transloqué à travers la membrane (van Dam et al., 2007). L'existence d'un mécanisme actif de transport du lipide II par un transporteur ABC (ATP-Binding-Cassette) ou une flippase membranaire a été suggéré. Cependant, il a été montré que la translocation du lipide II n'est ni dépendante de l'ATP, résultat à l'encontre de l'implication d'un transporteur ABC dans ce mécanisme, ni de la force proton motrice (van Dam et al., 2007). L'hypothèse la plus probable est donc l'existence d'une flippase membranaire dédiée à la translocation du lipide II. Cette flippase a été identifiée cette année chez *E.coli*. En effet, FtsW, qui est l'une des protéines essentielles de la machinerie de division bactérienne, permet également de transloquer le lipide II à travers la membrane cytoplasmique (Mohammadi et al., 2011).

La synthèse de peptidoglycane est cruciale lors de l'élongation et la division cellulaire. L'allongement des cellules, qui se produit selon un axe longitudinale, est suivi, lorsque une longueur spécifique est atteinte, de la division cellulaire, qui a lieu au milieu de la cellule. La coordination spatio-temporelle de la formation de la paroi cellulaire requiert une action concertée entre les éléments du cytosquelette bactérien et ceux de la machinerie de biosynthèse du peptidoglycane. (den Blaauwen et al., 2008). Il a été clairement établi un lien entre la protéine MreB et les enzymes cytoplasmiques requises pour la biosynthèse du peptidoglycane par l'identification d'interactions entre MreB et MurG (Divakaruni et al., 2007; Mohammadi et al., 2007). MreB est un élément essentiel du cytosquelette, s'assemblant en une structure filamenteuse à l'intérieur du cytoplasme (van den Ent et al., 2001; Esue et al., 2005), formant une hélice tout autour de la cellule et jouant ainsi un rôle clé dans la maintenance de la morphologie de la cellule (Carballido-López and Errington, 2003; Gitai et al., 2004). Les enzymes MurB, C, D, E, F, G sont localisées dans le cytoplasme d'une manière dépendante du comportement des filaments de MreB, suggérant l'existence d'interactions avec le cytosquelette. De plus, MurF interagit avec MurG et la protéine transmembranaire MraY (White et al., 2010). Ces résultats suggèrent l'existence potentielle d'un complexe cytoplasmique impliquant les protéines solubles Mur, les protéines transmembranaires Mur G et MraY et la protéine du cytosquelette MreB. Ce complexe pourrait non seulement limiter la diffusion des intermédiaires solubles du peptidoglycane mais aussi les canaliser vers la face interne de la membrane facilitant ainsi le transport du lipide II vers le périplasme.

c) Polymérisation du peptidoglycane

Une fois du côté externe de la membrane plasmique, le lipide II va subir deux réactions : la polymérisation des chaînes de glycane et la liaison entre les différentes queues peptidiques (Fig.5 et Fig.6).

Les transglycosylations, catalysées par les transglycosylases, permettent tout d'abord de relier les composés sucrés des précurseurs (NAM-GlcNac) entre eux afin de former une chaîne glycosidique entre les différents monomères (NAM- GlcNac -NAM- GlcNac...). Ces liaisons sont de type β 1-4 et leur longueur peut varier d'une bactérie à l'autre. *S. aureus* assemble par exemple 20 unités disaccharidiques (NAM- GlcNac) alors que *B. subtilis* polymérise jusqu'à 100 unités de ce type (Ward, 1973; Tipper and Strominger, 1968).

Puis, l'intervention de transpeptidases, permet la formation de liaisons covalentes entre les différentes unités pentapeptidiques des précurseurs. Cette liaison est directe chez *B. subtilis* ou *E. coli* : le résidu D-alanine en 4^{ème} position d'un premier précurseur est ainsi relié au résidu meso-acide diaminopimélique en 3^{ème} position d'un autre précurseur.

Enfin, la maturation du peptidoglycane est complétée par des carboxypeptidases pouvant cliver les résidus D-alanine sur les pentapeptides. Suivant les bactéries, la proportion de chaînes pentapeptidiques reliées entre elles dans la paroi varie énormément. Elle est généralement faible (20 %) pour les bactéries à Gram négatif, alors qu'elle est maximale (proche de 100%) chez les bactéries à Gram positif (Labischinski and Maidhof, 1994).

• Les PBPs ou Penicillin Binding Proteins

Les enzymes participant à la polymérisation du peptidoglycane sont des protéines appartenant à la famille des PBPs, nommées ainsi car elles sont les cibles d'antibiotiques de la famille de la pénicilline, les β -lactames. Les bactéries possèdent un nombre variable de PBPs et, depuis que le séquençage de nombreux génomes bactériens a été réalisé, le nombre de PBPs de chaque bactérie est bien connu. Par exemple, *B. subtilis* en possède 16, alors que *E. coli* en possède 3 et *Neisseria gonorrhoeae* seulement 4 (Sauvage et al., 2008). Les PBPs ont été divisées en deux grandes catégories : les PBPs de hauts poids moléculaires ou HMM (> à 60 kilodalton) et les PBPs à petits poids moléculaires ou LMM (< à 60 kilodalton).

Les PBPs HMM sont multimodulaires et plurifonctionnelles. Elles sont responsables de la polymérisation du peptidoglycane et de son insertion dans la paroi cellulaire préexistante

(Goffin & Ghuysen, 1998; Born et al, 2006). Leur topologie est constituée d'une queue cytoplasmique, d'une ancre transmembranaire, et deux domaines, portant les fonctions enzymatiques, situés sur la surface externe de la membrane cytoplasmique où a lieu la synthèse du peptidoglycane(Goffin and Ghuysen, 1998; Macheboeuf et al., 2006). Les PBPs HMM sont réparties en deux classes en fonction de la structure et de l'activité catalytique de leur domaine N-terminal.

Les PBPs de classe A sont bi-fonctionnelles avec une activité transglycosylase portée par leur partie N-terminale et une activité transpeptidase sur leur partie C-terminale(Goffin and Ghuysen, 1998). Les bactéries à Gram positif et faible taux de G+C (Firmicutes) ont pour la plupart plusieurs PBPs de classe A. Cette redondance vient probablement du fait que ces PBPs interviennent dans une fonction essentielle de la bactérie. Par exemple, *B. subtilis* possède quatre PBPs de classe A, dont PBP1 qui fait partie de la machinerie de division cellulaire et est nécessaire à la formation du septum asymétrique lors de la sporulation(Scheffers and Errington, 2004).

Les PBPs de classe B ont également un domaine C-terminal à activité transpeptidase mais la fonction de leur domaine N-terminal n'est pas totalement élucidée. Ce domaine est supposé jouer un rôle dans la morphogenèse des cellules en interagissant avec d'autres protéines impliquées dans le cycle cellulaire(Höltje, 1998; den Blaauwen et al., 2008; Zapun et al., 2008). Beaucoup de PBPs de classe B interviennent dans la formation de peptidoglycane lors de processus cellulaires spécifiques. Chez *B. subtilis*, la protéine PBP2best spécifique à l'assemblage et au fonctionnement de la machinerie de division cellulaire(Daniel et al., 2000), alors que la PBP-SpoVD est requise pour la synthèse du peptidoglycane du cortex recouvrant la spore(Daniel et al., 1994).

Les LMM, ou PBPs de classe C, peuvent exercer des activités carboxypeptidase et/ou endopeptidase, clivant les liaisons peptidiques à l'intérieur du pentapeptide dans le but de réguler la polymérisation du peptidoglycane(Sauvage et al., 2007; Chen et al., 2009). Chez *B. subtilis*, on trouve six gènes codant pour des PBPs LMM. PBP4 est une endopeptidase clivant les ponts reliant deux chaînes de glycane et PBP5, la D-D- carboxypeptidase majeure, clivant les chaînes pentapeptidiques non reliées en les réduisant en tripeptides(Lawrence and Strominger, 1970; Todd et al., 1985). Deux autres carboxypeptidases similaires à PBP5 sont présentes chez *B. subtilis*: PBP5* intervient plus spécifiquement lors de la synthèse de peptidoglycane de la spore naissante(Popham et al., 1995) et DacF régule le degré de réticulation du peptidoglycane des spores(Popham et al., 1999). Enfin, PBP4* et PBPX sont supposées agir comme des endopeptidases pouvant cliver les liaisons croisées reliant les

différentes chaînes pentapeptidiques(Korat et al., 1991) et semblent être impliquées dans la sporulation(Scheffers, 2005).

- Renouvellement des couches de la paroi

Il a été montré que les couches les plus anciennes sont poussées vers la surface externe de la paroi au fur et à mesure que de nouvelles couches sont ajoutées du côté interne. Les couches parvenant à la surface externe sont dégradées et relâchées dans le milieu extracellulaire.

L'activité de synthèse de peptidoglycane n'est pas uniforme sur toute la surface cellulaire. Pendant la croissance, elle est par exemple plus faible au niveau des pôles et lors de la division cellulaire, elle est concentrée au centre de la cellule et permet la formation du septum. Ceci a été montré en observant la localisation des PBPs pendant le cycle cellulaire. Chez *B. subtilis*, les PBPs de classe A sont généralement localisées au site de septation(Pedersen et al., 1999) et chez *E. coli*, PBP2 est localisée au niveau de ce même site pendant la division cellulaire puis disparaît après la septation(Den Blaauwen et al., 2003).

Ce renouvellement constant des couches de peptidoglycane nécessite, outre les carboxypeptidases, l'action d'autres protéines appelées autolysines. Ces enzymes peuvent cliver spécifiquement certaines liaisons au niveau du polymère de peptidoglycane. Il existe de nombreuses enzymes de ce type chez *E. coli* et *B. subtilis* et elles sont classées suivant leur spécificité de substrat. On trouve des muramidases, des hydrolases, des transglycosylases lytiques, des amidases et plusieurs endopeptidases(Höltje, 1998; Smith et al., 2000). Le renouvellement des couches de peptidoglycane nécessite l'action des autolysines car elles permettent l'ouverture d'espaces dans la structure. Chez *B. subtilis*, l'autolysine LytC pourrait jouer ce rôle(Smith et al., 2000).

d) Régénération du translocateur lipidique

L'étape qui termine la biosynthèse du peptidoglycane est la régénération de l'undecaprénol-phosphate (UP), seule molécule capable de fixer un nouveau précurseur NAM-pentapeptide. Une fois le précurseur monomérique (NAM-GlcNac-pentapeptide) transloqué et incorporé dans la paroi, l'UPP formé doit, d'une part, retrouver sa forme

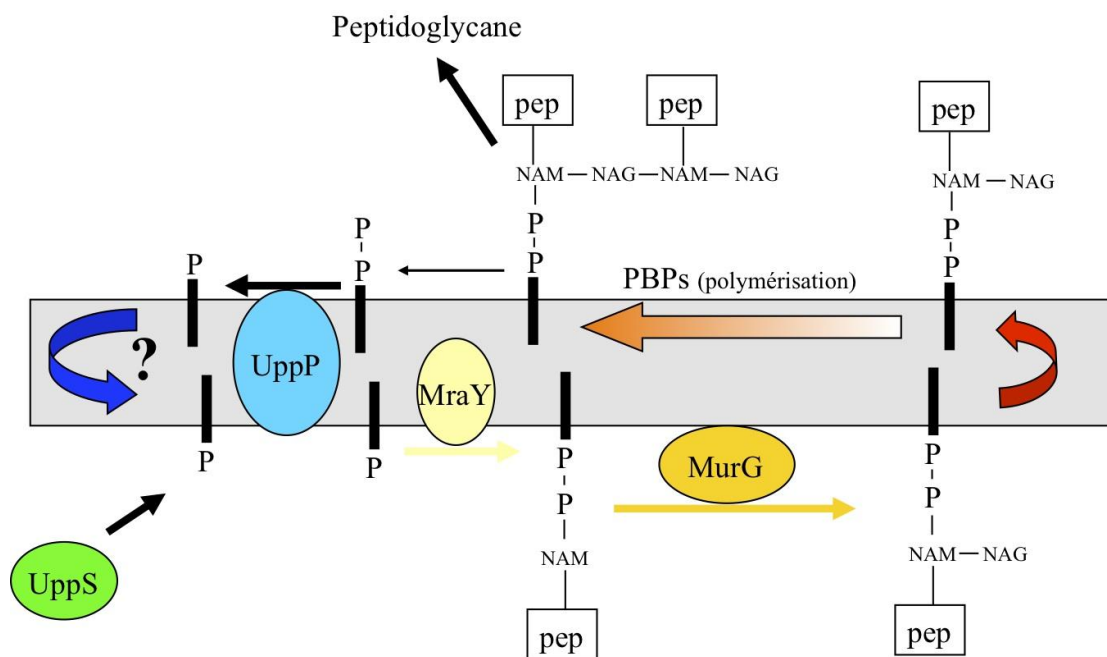


Fig.8 : Dernière étape du cycle de biosynthèse du peptidoglycane, la régénération du translocateur lipidique. Undécaprényl phosphate : UppP, UPP Phosphatase : UppS, UPP synthase : pep, pentapeptide; PBPs : Penicillin Binding Proteins.

monophosphorylée, UP, et d'autre part, être transloqué à nouveau dans le feuillet interne de la membrane (Fig.8).

De nombreuses études ont permis de caractériser les enzymes intervenant dans la déphosphorylation de l'UPP en UP. Ces enzymes sont des protéines membranaires nommées UPP Phosphatases et sembleraient agir du côté externe de la membrane cytoplasmique (Tatar et al., 2007). Leur activité étant extrêmement importante pour les microorganismes, ces derniers possèdent de manière redondante plusieurs UPP phosphatases appartenant à des familles différentes. Ainsi *E. coli*, en possède 4 nommées BacA, PgpB, YbjG et YeiU. L'absence de trois d'entre elles (BacA, PgpB et YbjG) est létale pour la cellule (El Ghachi, Derbise, Bouhss, & Mengin-Lecreulx, 2005). Ces protéines ont toutes 5 à 8 fragments transmembranaires et appartiennent à deux familles différentes.

BacA, qui fait partie de la première famille, est responsable à elle seule de 75% de l'activité UPP phosphatase de la cellule. Cependant, la délétion du gène codant pour BacA, chez cette bactérie, n'est pas létale, car elle est compensée par la présence de 3 autres UPP phosphatases (El Ghachi et al., 2004). Les différentes protéines BacA identifiées respectivement chez *E.coli*, *S. aureus* et *S. pneumoniae* sont très similaires (Chalker et al., 2000). La protéine hypothétique YubB de *B. subtilis* est un homologue de BacA et est supposée comme essentielle à la survie de cette bactérie (Cao and Helmann, 2002).

La deuxième famille, à laquelle appartiennent PgpB, YbjG et YeiU, est très bien caractérisée et appelée famille des Phosphatases Acides Phosphatidiques ou PAP₂. Elle regroupe plus de 600 protéines impliquées dans de nombreuses voies métaboliques différentes. On y trouve la Glucose-6-phosphatase de *Homo sapiens* (Lei et al., 1993), une phosphatase acide de *Mus musculus*, la protéine PgpB d'*E. coli* qui a une double activité UPP phosphatase et phosphatidylglycérolphosphate phosphatase (Icho and Raetz, 1983), la phosphatase acide non-spécifique PhoN de *Salmonella typhimurium* (Kasahara et al., 1991), la sphingosine-1-phosphate phosphatase de *H. sapiens* (Ogawa et al., 2003) ou encore la phosphotyrosyl phosphatase de *Prevotella intermedia* (Chen et al., 1999). Dans cette famille, on trouve également BcrC de *B. subtilis*. D'abord classifiée comme un domaine transmembranaire d'un ABC transporteur, cette protéine est en fait une UPP phosphatase intervenant dans la résistance à la bacitracine (Bernard et al., 2005).

Si les mécanismes moléculaires impliqués dans la réaction de déphosphorylation de l'UPP en UP sont assez bien documentés, le mécanisme agissant dans la translocation de l'UPP libre dans le feuillet interne de la membrane reste encore inconnu et les hypothèses sur l'intervention ou non d'un mécanisme de transport actif restent non démontrés.

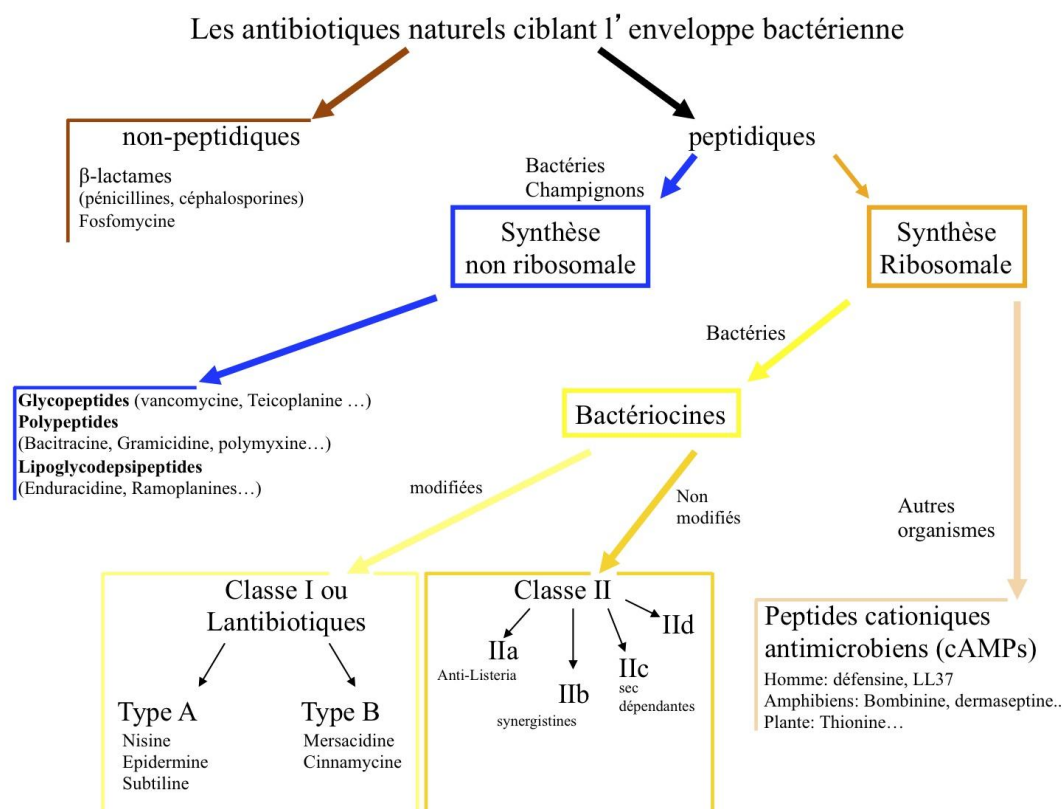


Fig.9 : Classification des antibiotiques naturels ciblant l'enveloppe bactérienne

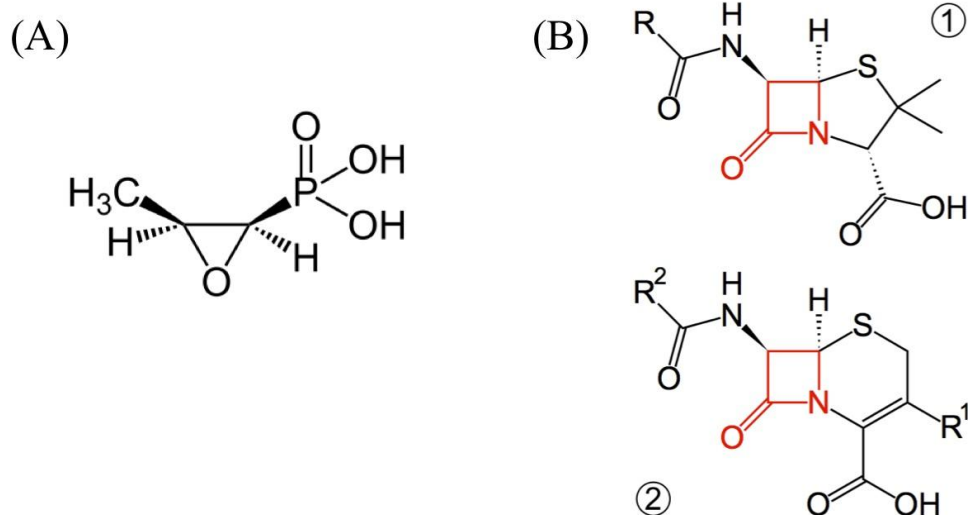


Fig.10 : Exemples de structure des antibiotiques non peptidiques.

(A) Structure de la fosfomycine, avec son anneau oxirane.

(B) Structure des pénicillines (1) et des céphalosporines (2), appartenant au groupe des β -lactames. L'anneau β -lactame, caractéristique de cette classe est indiqué en rouge.

B) Diversité des antibiotiques ciblant la paroi bactérienne

Au cours des dernières décennies, plusieurs centaines d'antibiotiques naturels ont été répertoriés et classifiés en fonction de leur structure, leur origine, leur mécanisme d'action ou leur cible. Les antibiotiques ciblant la paroi bactérienne font partis de différentes catégories car ils peuvent être de nature non-peptidiques ou peptidiques à synthèse ribosomique ou à synthèse non ribosomique (Fig.9).

1) Les antibiotiques non peptidiques

Bien que contenant parfois des acides aminés ces antibiotiques ne sont pas des peptides. Par exemple, les β -lactames possèdent un même site actif, constitué de l'association d'une cystéine et d'une valine donnant une structure type lactone et nommé anneau β -lactame (Fig.10). L'exemple le plus connu des β -lactames est la pénicilline synthétisée par le champignon *Penicillium chrysogenum*. Dans ce groupe, on trouve également les céphalosporines et les pénèmes.

La fosfomycine ou acide phosphonique est synthétisée chez les *Streptomyces* par un mécanisme de synthèse faisant intervenir des réactions d'oxydations catalysées par des époxydases à Fer(Liu et al., 2004). La caractéristique structurale de cet antibiotique est la présence d'un anneau oxirane (Fig.10)

2) Les antibiotiques peptidiques à synthèse ribosomique

Les antibiotiques de ce groupe peuvent aussi bien être synthétisés par les microorganismes, les plantes, les insectes ou les animaux. Cependant, leurs séquences primaires sont peu similaires entre elles, ce qui suggèrerait que chaque antibiotique est adapté à l'environnement dans lequel il est produit ou à l'espèce bactérienne cible de la niche écologique(Hancock and Chapple, 1999). Ainsi, la grande répartition de cette classe d'antibiotique dans le monde du vivant peut être directement reliée à leur capacité à apporter à l'organisme producteur une immunité innée contre une menace microbienne spécifique(Boman, 1995). En effet, ces molécules sont très largement synthétisées par les cellules immunitaires chez les eucaryotes (macrophages, neutrophiles...) et ont parfois des

propriétés

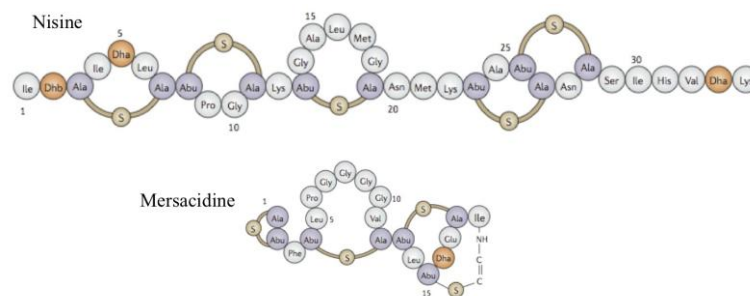


Fig.11 : Exemples de structure de lantibiotiques : la nisine, un lantibiotique de type A et la mersacidine, un lantibiotique de type B. Les résidus dérivant de modifications post-traductionnelles sont indiqués en orange (Dha : déhydroalanine ; Dhb : dehydrobutyrine). D'après (Breukink and de Kruijff, 2006).

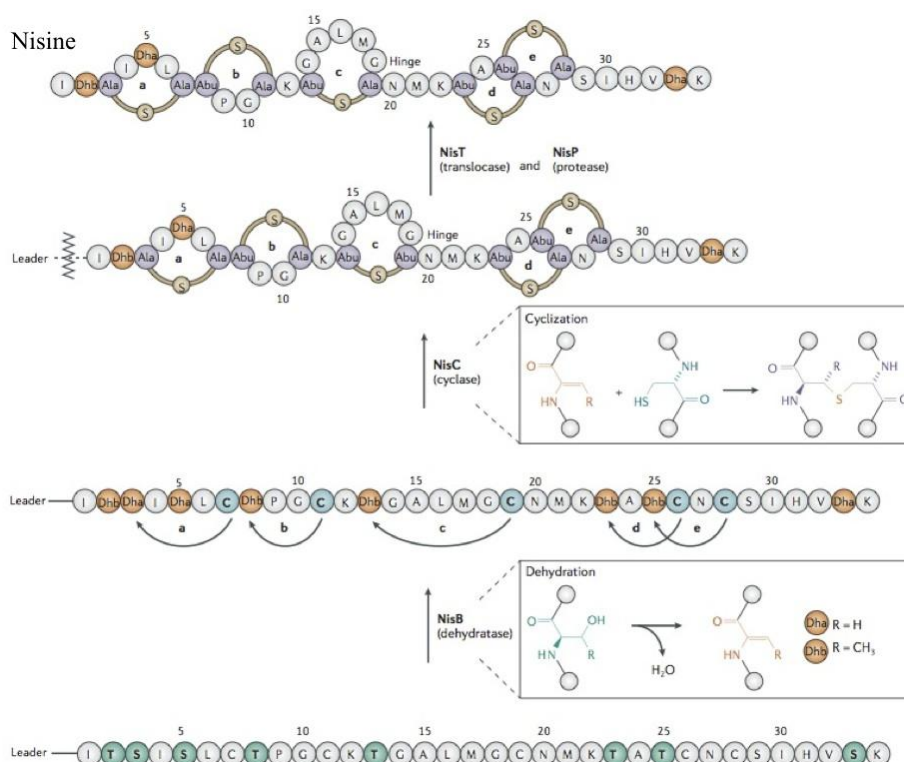


Fig.12 : Modifications post-traductionnelles de la nisine.

Comme tous les autres lantibiotiques, la nisine est produite sous la forme d'un précurseur inactif contenant un peptide signal ou peptide leader qui dirige les modifications et le transport du peptide. Les modifications sont effectuées en deux étapes. Tout d'abord, la déshydratation des serines et des thréonines (vert) par l'enzyme NisB conduisant respectivement aux résidus déhydroalanine (Dha) ou déhydrobutyrine (Dhb) (orange). Ensuite, l'enzyme NisC catalyse la cyclisation des dehydrorésidues par l'addition de résidus cystéine, formant ainsi des anneaux lanthionine (Ala-S-Ala : lanthionine, Abu-S-Ala : méthyllanthionine). Lorsque les modifications sont terminées, l'enzyme NisT transloque le peptide à travers la membrane, puis NisP clive le peptide signal, conduisant à la forme finale de l'antibiotique : la nisine. Les cinq anneaux lanthionine de la nisine sont notés de a à e. D'après (Breukink and de Kruijff, 2006)

chimioattractives pour faciliter les réponses immunitaires. C'est le cas du LL-37, synthétisé par les cellules neutrophiles humaines, et qui, en plus de son activité antimicrobienne, participe à l'attraction des leucocytes au site d'infection(Dürr and Peschel, 2002).

Les peptides antimicrobiens à synthèse ribosomique produits par les bactéries sont nommés bactériocines. La plupart des bactéries à Gram positif qui produisent des bactériocines appartiennent au sous groupe des Firmicutes lactiques, telle que *Lactococcus lactis*(Sablon et al., 2000). Une classification plus détaillée de ces bactériocines a été proposée suivant leur séquence primaire.

Les bactériocines de classe I regroupent les peptides sujets à d'importantes modifications post-traductionnelles, comme c'est le cas des lantibiotiques. Ces lantibiotiques sont très répandus dans le groupe des Firmicutes. On y trouve par exemple la nisine de *L. lactis*, la subtiline de *B. subtilis*, l'épidermine de *S. epidermidis*, la mutacine de *S. mutans* ou encore la mersacidine de *Bacillus sp.* (Fig.11).

La biosynthèse et les modifications post-traductionnelles des lantibiotiques sont bien décrites (Fig.12). Ainsi, les clusters de gènes de synthèse de lantibiotiques contiennent toujours un gène de structure, codant pour un polypeptide précurseur ou pro-peptide, plus long que le peptide mature, ainsi que des gènes codant pour les enzymes nécessaires aux multiples modifications du pro-peptide (déshydratase, thioestérase, protéase...). Ce cluster contient également des gènes codant pour la sécrétion du peptide dans le milieu extérieur et enfin des gènes codant pour un système d'immunité conférant une résistance innée à l'antibiotique produit(Baba and Schneewind, 1998; Garrido et al., 1988; Sahl et al., 1995). Les lantibiotiques sont divisés en deux catégories en fonction de leur structure et de leur mode d'action(Twomey et al., 2002). Les lantibiotiques de type A, ou Nisin-like, ont un spectre d'action assez large et ont comme cible la membrane bactérienne en interagissant avec plusieurs types de molécules présentes au niveau de cette membrane. Les lantibiotiques de type B, ou Cinnamycin-like, sont à spectres plus étroits, surtout actifs contre les espèces proches de l'organisme producteur. Ils peuvent affecter spécifiquement une fonction essentielle chez la bactérie cible ou également perturber l'intégrité membranaire mais en interagissant alors avec une cible spécifique au niveau de la membrane.

Les bactériocines de classe II ne subissent pas de modifications post-traductionnelles. Ce sont de petits peptides de 20 à 60 aminoacides qui sont généralement actifs chez les Firmicutes. On peut distinguer 4 sous-classes nommées IIa, IIb, IIc et IId(Nes and Holo, 2000). La sous-classe IIa est la mieux caractérisée car on y trouve des peptides présentant une

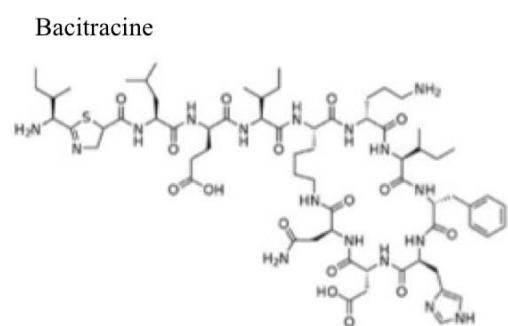
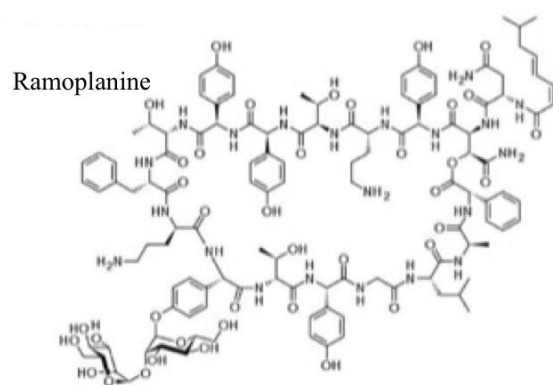


Fig.13 : Exemples d'antibiotiques à synthèse non ribosomique.

forte similarité entre eux aussi bien au niveau de leur séquence primaire qu'au niveau de leur activité dirigée contre les espèces du genre *Listeria*(Ennahar et al., 2000). Les bactériocines de classe IIb, ou synergistines, ont la particularité de fonctionner par paires complémentaires de deux peptides. Ainsi, la lactacine F, produite par *Lactobacillus johnsonii*, provient de l'action simultanée des deux peptides LafA et LafX, dont les gènes de structures sont tous deux présents dans l'opéron *laf*(Abee et al., 1994). On classe globalement dans les bactériocines de type IIc celles qui présentent la particularité d'être sécrétées par la voie générale de sécrétion Sec- dépendante. Enfin, la dernière sous-classe, IId, regroupe d'autres bactériocines ne présentant pas de similarité particulière.

3) Les antibiotiques peptidiques à synthèse non ribosomique

Les antibiotiques de cette nature sont exclusivement synthétisés par les bactéries et les champignons. Ce sont des peptides de petite taille, le plus grand découvert à ce jour étant l'alaméthicine, synthétisé par le champignon *Trichoderma viride*, qui comprend 20 résidus(Mohr and Kleinkauf, 1978). Leur synthèse ne dépendant pas d'un transcrit de type ARN messenger, ces antibiotiques peuvent contenir des acides aminés inhabituels, comme les aminoacides hydroxylés (les L- ou D-aminoacides) ou les aminoacides déshydratés. En effet, contrairement à la synthèse ribosomique qui utilise seulement vingt acides aminés, le processus de synthèse non ribosomique peut en faire intervenir plus de trois cent, résultant en une grande diversité de structure. De plus, au cours de leur synthèse, ces antibiotiques peuvent subir d'importantes modifications comme la glycosylation, l'acylation, le cyclisation ou la méthylation. Ce processus entraîne donc une très grande diversité de synthèse. Ainsi, il n'est pas rare qu'un antibiotique soit synthétisé sous forme d'un mélange de plusieurs molécules différentes plus ou moins actives. Par exemple, les ramoplanines (Fig.13), synthétisées par les *Actinomycetes*, se présentent sous trois formes distinctes A1, A2 et A3, différenciées au niveau de la taille de leur chaîne N-terminale, mais possédant une activité antimicrobienne très similaire(McCafferty et al., 2002). De même, la bacitracine (Fig.13), produite par *B. licheniformis* et certaines souches de *B. subtilis*, est également synthétisée sous plusieurs formes A, B, D, E, H et F, différant énormément quant à leur activité antibiotique et leur interaction avec la cible(Ming and Epperson, 2002).

La biosynthèse des peptides non-ribosomaux est appelée mécanisme «multi-carrier

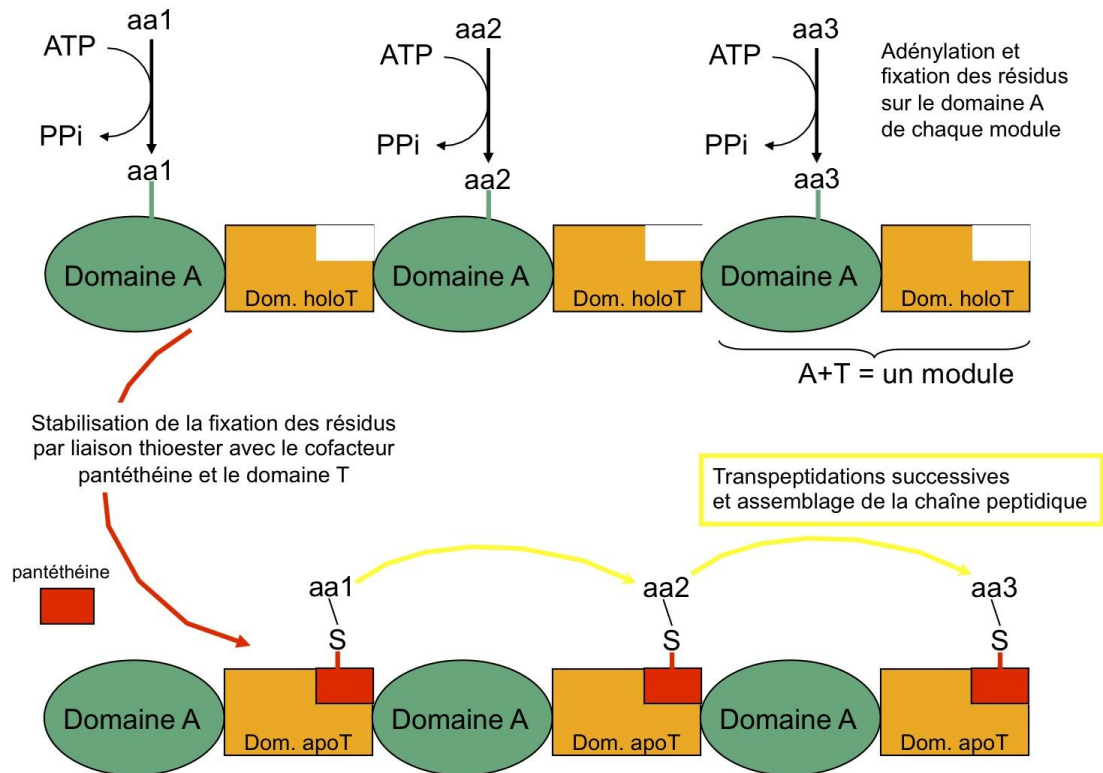


Fig.14 : Biosynthèse non ribosomique des antibiotiques peptidiques.

Chaque résidu aminoacide est activé par adénylation à partir d'une molécule d'ATP puis fixé au domaine A de chacun des modules de la peptide synthétase. La fixation du résidu est ensuite stabilisée par une liaison thioester entre le résidu, le cofacteur pantéthéine et le domaine T de chaque module. Enfin, des réactions de transpeptidations successives permettent l'assemblage séquentiel de la chaîne polypeptidique. D'après (Stein et al., 1996; Konz and Marahiel, 1999) .

thiotemplate » (Fig.14)(Stein et al., 1996). Il fait intervenir des complexes multienzymatiques appelés « non-ribosomal peptides synthetases » (NRPS) contenant plusieurs modules assurant la synthèse ordonnée du peptide. Chaque module enzymatique possède la capacité de reconnaître un résidu aminoacide, de l'activer et de le modifier si nécessaire, puis de l'incorporer à la chaîne peptidique naissante. Cela sous-entend que chaque module doit posséder un domaine spécifique dédié à la réalisation de ces différentes étapes. Ainsi, la taille du gène codant pour une seule peptide synthétase est très grande : 13 kbp pour le gène *grsB* de l'opéron de biosynthèse de la gramicidine S(Stachelhaus and Marahiel, 1995).

Lors de la biosynthèse non-ribosomique, chacun des résidus aminoacides est tout d'abord activé par adénylation à partir d'une molécule d'ATP, puis fixé au domaine A de leur module respectif. Cette fixation est ensuite stabilisée par une liaison thioester réalisée par le domaine T de chaque module. Enfin, l'assemblage de la chaîne peptidique se fait par des réactions successives et ordonnées de transpeptidations(Stein et al., 1996; Konz and Marahiel, 1999). La libération du peptide est ensuite réalisée par le domaine Te ou thioestérase, qui va couper la liaison thioester reliant le peptide synthétisé au domaine T. Par ailleurs, les modules peuvent contenir des domaines enzymatiques supplémentaires permettant d'effectuer des modifications au niveau des acides aminés, comme l'épimérisation, la méthylation ou encore la formylation.

C) Diversité des modes d'action des antibiotiques ciblant la paroi bactérienne

L'enveloppe bactérienne est une cible majeure de nombreux antibiotiques appartenant aux différentes classes mentionnées ci-dessus. Certains antibiotiques ciblent directement l'enveloppe en perturbant son intégrité, tandis que d'autres ciblent spécifiquement les mécanismes d'assemblage de la paroi.

1) Perturbation de l'intégrité membranaire

Une grande partie des antibiotiques peptidiques à synthèse ribosomique, ainsi que certains peptides à synthèse non-ribosomique sont amphiphiles, ce qui est à la base de leur mode d'action. En effet, ils ciblent préférentiellement les phospholipides chargés négativement, qui sont présents sur la surface externe de la membrane plasmique des cellules bactériennes.

Ces antibiotiques peptidiques et cationiques ont donc une action spécifique sur les membranes bactériennes. En effet, les cellules eucaryotes n'ont pratiquement pas de charges négatives exposées à la surface externe de la membrane: d'une part, elles contiennent des molécules de cholestérol et, d'autre part, leurs phospholipides chargés négativement sont exposés à la surface interne de la membrane(Zasloff, 2002). On parle ainsi du concept de discrimination des lipides, selon lequel la composition en lipides influence fortement les mécanismes moléculaires de dommages membranaires(Lohner and Blondelle, 2005; Sevcsik et al., 2007). Par exemple, les peptides à structure en feuillet β , comme la tachyplesin(Nakamura et al., 1988), le peptide neutrophile humain(White et al., 1995; Lohner et al., 1997) ou la protégrine-1 produite par les leucocytes de porc(Lohner, 2009), interagissent avec les phospholipides présents à la surface de la membrane bactérienne mais pas avec ceux présents à la surface des cellules de mammifères. Le même comportement a été constaté pour certains peptides à structure en hélices α , comme la magainine, un peptide antimicrobien présent sur la peau des grenouilles(Matsuzaki et al., 1997). Ceci démontre l'importance des interactions électrostatiques dans l'affinité des peptides antimicrobiens pour les membranes bactériennes.

Il a ainsi été clairement montré que la partie hydrophile et cationique des antibiotiques

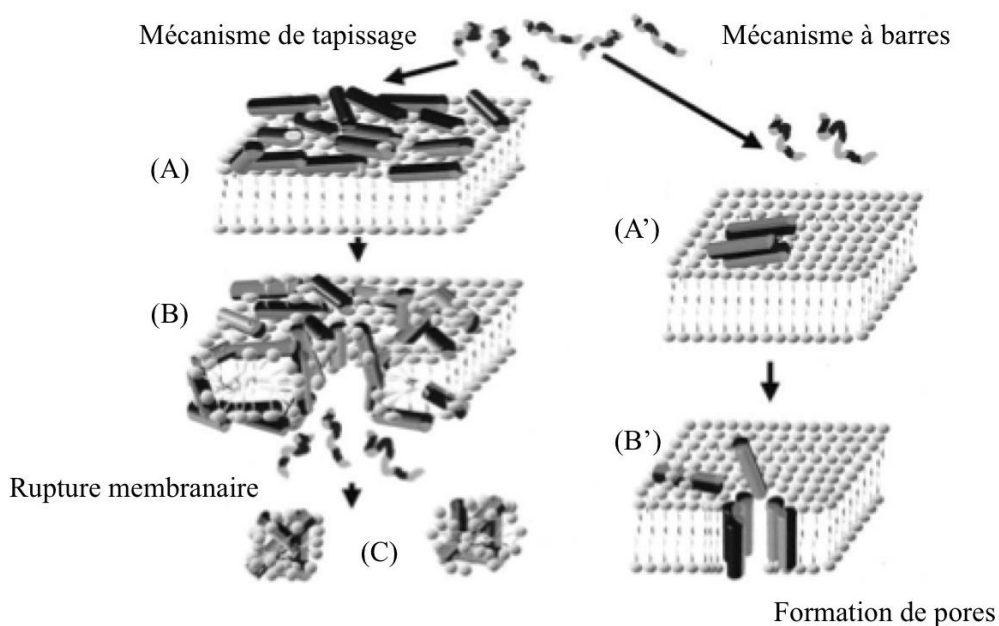


Fig.15 : Mécanismes de formation de pores membranaires.

On distingue deux types de mécanisme : le mécanisme de tapisage, à gauche et le mécanisme à barres, à droite. Selon le mécanisme de tapisage, les peptides antibiotiques sont liés à la surface membranaire par leurs faces hydrophobes (A). Lorsqu'une concentration en antibiotique suffisante est atteinte, la membrane est couverte de peptides et des pores transitoires peuvent être formés (B), conduisant à une rupture membranaire (C). Selon le mécanisme à barres, les peptides s'assemblent, dans un premier temps, sur la surface membranaire (A'), puis s'insèrent dans la bicouche lipidique de la membrane, formant ainsi un pore à travers la membrane (B'). D'après (Shai and Oren, 2001).

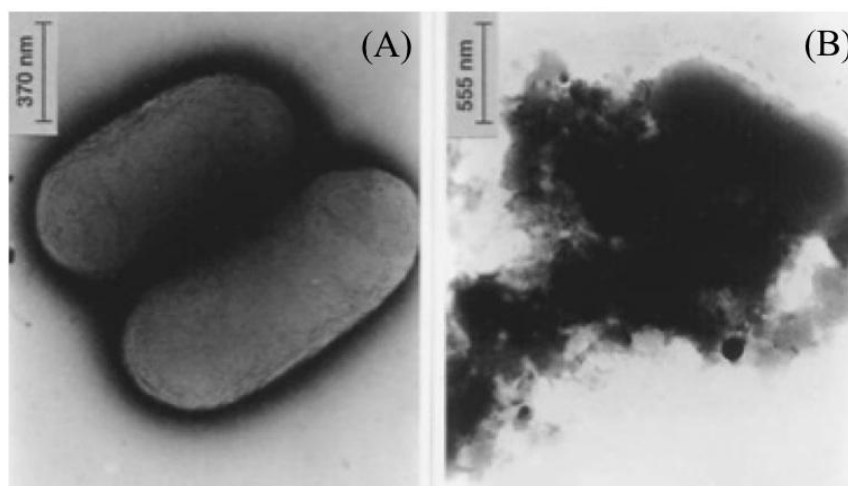


Fig.16 : Visualisation au microscope électronique d'une souche d'*E. coli* en présence ou non de LL-37. (A) En absence de LL-37, la souche apparaît normale. (B) En présence de LL-37, la bactérie est lysée et partiellement désintégrée par effet des ruptures membranaires causées par l'antibiotique.

D'après (Shai and Oren, 2001).

peptidiques peut interagir avec les groupements phosphates de la membrane plasmique par liaisons électrostatiques et former plusieurs types de pores (Zaslhoff, 2002). Les interactions des antibiotiques cationiques avec la membrane cytoplasmique ont fait l'objet de nombreuses études (Matsuzaki, 2001; Oren and Shai, 1998; Yang et al., 2000; Shai and Oren, 2001) et l'on distingue deux mécanismes de formation de pores membranaires (Fig.15).

Le premier mécanisme, appelé « à barres » (Ehrenstein and Lecar, 1977), se rencontre seulement avec les peptides cationiques ayant une structure en hélices α et amphiphile (Fig.15). Ces hélices α se fixent au niveau des phospholipides membranaires sous forme monomérique, puis interagissent entre elles à la surface de la membrane. Leur face hydrophobe leur permet alors de s'insérer dans la membrane et de former un pore. La taille du pore est ensuite agrandie par recrutement d'autres monomères et peut être maintenue grâce à la face hydrophile de chaque hélice α qui exerce une force d'opposition avec ses partenaires. Ce mécanisme est notamment observé pour l'alaméthicine (Huang, 2000).

Le deuxième mécanisme d'action est appelé mécanisme de « tapissage » et concerne un grand nombre d'antibiotiques peptidiques. Pour celui-ci, il est proposé que les peptides cationiques interagissent de manière électrostatique avec les groupements phosphates des phospholipides membranaires, puis adoptent une conformation en hélice α et tapissent la membrane (Fig.15). Ceci nécessite l'action d'une grande concentration de peptides. Suite à ce tapissage, la propriété amphiphile des peptides cationiques permet une réorientation des phospholipides membranaires engendrant des ruptures de la bicouche lipidique. La taille importante de ces ruptures au niveau de la membrane plasmique entraîne la lyse rapide de la cellule. Ce mécanisme de tapissage explique également que certains peptides cationiques puissent franchir la membrane externe des bactéries à Gram négatif afin d'atteindre la membrane plasmique. Une des étapes préalables à la rupture membranaire est la formation de pores, appelés toroïdaux, dans lesquels les hélices α de l'antibiotique restent fixées aux groupements phosphates de phospholipides et modifient la courbure de la bicouche. Ce mécanisme a été proposé la première fois pour décrire le mode d'action de la dermaseptine (Pouny et al., 1992), puis plus tard pour décrire celui des cecropines, peptides bactéricides du système de défense des insectes (Gazit et al., 1994; Gazit et al., 1995; Gazit et al., 1996) ou encore celui du LL-37, peptide antimicrobien humain (Oren et al., 1999) (Fig.16).

D'autres antibiotiques formant des pores membranaires ont des cibles spécifiques parmi les constituants de la membrane. C'est le cas des antibiotiques de type A, tels que la nisine ou

l'épidermine, qui lorsqu'ils sont en faibles concentrations s'ancrent au niveau du lipide II et

forment des « pores ciblés » ou « pores à hautes spécificités »(Breukink et al., 1999) et lorsqu'ils sont en fortes concentrations, ont également la capacité de cibler les phospholipides membranaires et de former des pores moins spécifiques(Van Den Hooven et al., 1996).

Les lantibiotiques de type B similaires à la cinnamycine, ont un spectre d'action assez étroit sur les bactéries à Gram positif du genre *Bacillus*. En interagissant avec les phosphatidyléthanolamines de la membrane cytoplasmique(Machaidze and Seelig, 2003), ils affectent les échanges membranaires ATP dépendants(Navarro et al., 1985) et augmentent fortement la perméabilité membranaire(Racker et al., 1984).

Enfin, certaines bactériocines de classe IIa, comme la mésentéricine(Dalet et al., 2001), la leucocine A(Ramnath et al., 2000) et la lactococcine A(Diep et al., 2007), ont un mode d'action similaire sur les espèces du genre *Listeria*. Ces bactériocines interagissent avec la membrane *via* la perméase à mannose du système des phosphotransférases (PTS), ce qui pourrait engendrer un changement de conformation de la perméase, qui, en s'ouvrant, participerait à la perméabilisation de la membrane.

La modification de l'intégrité de la membrane plasmique peut avoir plusieurs conséquences létales pour la cellule. Avant la lyse de la cellule proprement dite, la formation de pores au niveau de la membrane provoque la fuite du matériel hydrophile cytoplasmique (cations, anions, aminoacides...). On observe trois types de résultantes à ces fuites membranaires : la dissipation du gradient de pH et donc de la force proton motrice, la rupture du potentiel transmembranaire ou enfin, une diminution rapide du pool de l'ATP intracellulaire. Les antibiotiques peptidiques cationiques peuvent engendrer une ou plusieurs de ces fuites en fonction de leur nature, de la taille des pores qu'ils forment et de leur mode d'action

2) Blocage de la synthèse de la paroi

Le mécanisme de biosynthèse du peptidoglycane est le site d'action de plusieurs antibiotiques, comme les β -lactamases, dont fait partie la pénicilline, ou les glycopeptides, auquel appartient la vancomycine. De plus, la structure du peptidoglycane est commune aux bactéries à Gram négatif et à Gram positif, ce qui fait de la synthèse de cette molécule une cible privilégiée. Une grande partie des étapes de cette biosynthèse peut être inhibée par un ou

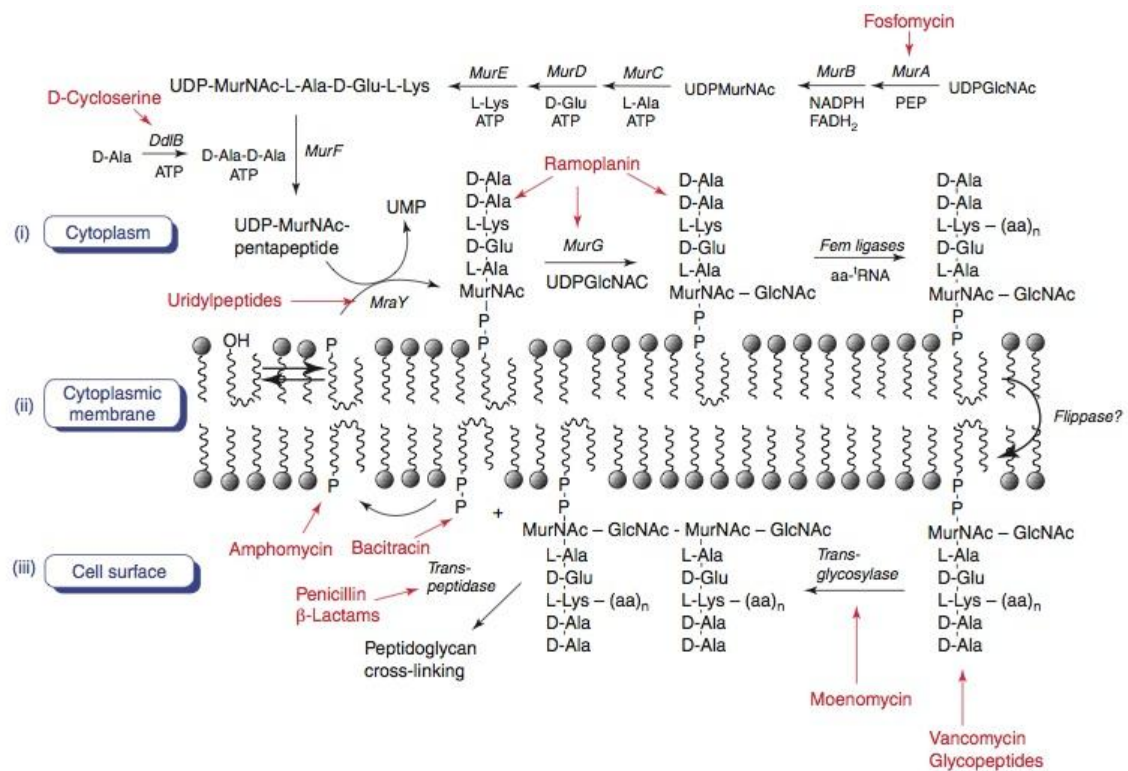


Fig.17 : Voie de biosynthèse du peptidoglycane et sites d'action de différents antibiotiques. D'après (Bugg et al., 2011).

plusieurs antibiotiques, mais la majorité de ceux-ci ciblent les étapes tardives de la synthèse du peptidoglycane.

a) Inhibition de la formation du précurseur monomérique

Ces antibiotiques ont pour cible les étapes primaires essentielles à la synthèse du précurseur monomérique de peptidoglycane, l'UPP-MurNAc-GlcNAc-pentapeptide ou lipide II. Ils agissent comme des inhibiteurs compétitifs des différentes enzymes impliquées dans la formation du lipide II.

Ainsi, MurA, l'énolpyruvate transférase qui catalyse la première réaction de la synthèse du peptidoglycane, à savoir, la formation d'UDP-NAM à partir de l'UDP-GlcNac et du phosphoénolpyruvate (PEP), est la cible de la fosfomycine (Fig.17). Cet antibiotique possède une structure très similaire au phosphoénolpyruvate ce qui lui permet agir comme un inhibiteur irréversible de MurA, *via* l'alkylation de son site actif (Bugg, 1999). Récemment, d'autres antibiotiques inhibant l'action de MurA ont été découverts. C'est le cas de la cnicine, un lactone sesquiterpénique, qui va complexer le produit de la réaction enzymatique catalysée par Mur A, l'UDP-N- acétylglucosamine-énolpyruvate (Bachelier et al., 2006), et de l'acide terreique, produit par le champignon *Aspergillus terreus*, qui agit comme un inhibiteur covalent de MurA, en se liant à son site actif (Han et al., 2010).

Des recherches récentes de nouveaux antibiotiques par criblages à haut débit ont permis d'identifier des inhibiteurs des enzymes MurB-F. Ainsi, la réductase MurB est la cible de différents imidazolinones (Bronson et al., 2003) et d'une série de 3,5-dioxypyrazolidines (Yang et al., 2006). La ligase MurC est inhibée par une série de benzofurane acyl-sulfonamides (Ehmann et al., 2004) et par une quinoxaline qui entre en compétition avec l'ATP (Zawadzke et al., 2008). MurD est la cible de plusieurs phosphinates (Strancar et al., 2006) qui, par ricochet, inhibent également MurE (Strancar et al., 2007). Un composé naturel provenant d'une plante colombienne, le 3-methoxynordomesticine, agit comme un inhibiteur de MurE chez *Mycobacterium tuberculosis* (Guzman et al., 2010). MurF est, quant à elle, inhibée par des arylsulfonamides (Gu et al., 2004) et des diarylquinolines (Baum et al., 2009).

La D-cyclosérine est un analogue rigide du résidu D- alanine et inhibe les deux réactions permettant la formation du dipeptide D-ala-D-ala ajouté à l'extrémité du pentapeptide (Fig.17). Les enzymes cibles de la D-cyclosérine sont, d'une part, la D- alanine racémase (formant la D-alanine à partir de L-alanine) et, d'autre part, la D-alanine ligase, qui

procède à la dimérisation des résidus D-alanine(Lambert and Neuhaus, 1972; Feng and Barletta, 2003). De plus, la glutamate racemase, qui synthétise l'acide D-glutamique, est inhibée par un groupe de pyrazolopyrimidinediones(de Jonge et al., 2009).

Enfin, la muréidomycine est également un compétiteur structural des substrats de l'enzyme *MraY*, la phospho-N-acétylmuramyl-pentapeptide translocase, qui catalyse la fixation de l'UDP-NAM-pentapeptide à la membrane par l'intermédiaire de l'Undécaprénylphosphate. Lorsque l'on regarde la structure de la muréidomycine, on y trouve une similarité importante avec les deux substrats de l'enzyme *MraY*, l'UDP-NAM-pentapeptide et l'undécaprénylphosphate(Isono and Inukai, 1991; Brandish et al., 1996). *MraY* est également la cible d'autres antibiotiques nucleosides comme certains muraymycines, liposidomycines ou encore tunicamycines(Winn et al., 2010).

b) Inhibition des étapes tardives de la synthèse du peptidoglycane

Différentes familles d'antibiotiques ciblent les étapes tardives de la synthèse du peptidoglycane. C'est le cas des β -lactames qui inhibent les PBPs (Penicillin Bindings Proteins) dont le rôle est d'insérer les monomères de peptidoglycane dans la paroi. D'autres antibiotiques inhibent la même voie de biosynthèse en ciblant le lipide II, molécule clé de la biosynthèse du peptidoglycane.

- Les β -lactames

Ces antibiotiques, les plus utilisés aujourd'hui, ciblent les étapes de polymérisation par transpeptidations du peptidoglycane (Fig.17). Dans cette famille, on trouve la pénicilline, mais également des céphalosporines, des monobactames et des carbapénèmes. Ils possèdent tous un cycle β -lactame qui mime l'extrémité du dipeptide D-ala-D-ala(Tipper and Strominger, 1968) et sont ainsi reconnus par le site actif des transpeptidases et des carboxypeptidases impliquées dans la réticulation des chaînes glycanes. Les β -lactames ciblent donc l'ensemble des PBPs, mais ne sont létales que lorsque les PBPs à hauts poids moléculaires, c'est à dire les enzymes portant les activités de transpeptidation, sont touchées(Josephine et al., 2006). Lorsque l'antibiotique interagit avec sa cible, un complexe

inactif, appelé transpeptidase penicilloylée, est formé et la réactivation de l'enzyme par une réaction

de déacylation est très lente. Le rendement de la transpeptidation est alors fortement affecté et la formation des liaisons peptidiques croisées permettant le rattachement des nouvelles couches de peptidoglycane est fortement ralentie (Tipper and Strominger, 1968; Waxman and Strominger, 1983).

- Le lipide II, une cible privilégiée de nombreux antibiotiques

Le lipide II, une fois transloqué du côté externe de la membrane est la cible de différentes classes d'antibiotiques.

Les glycopeptides, comme la vancomycine, ciblent le dipeptide D-ala-D-ala au niveau du précurseur monomérique de peptidoglycane (Fig.17). Ces antibiotiques peuvent se fixer sur cette cible très spécifique, aussi bien au niveau du lipide II, qu'au niveau des précurseurs partiellement rattachés au peptidoglycane. Ce type d'antibiotiques possède une grande affinité pour leur cible. Par exemple, lorsque la vancomycine interagit avec le dipeptide D-ala-D-ala, elle va former un complexe faisant intervenir 5 liaisons hydrogènes (Williams, 1996). La formation du complexe entre la vancomycine et le dipeptide D-ala-D-ala va entraîner la séquestration du substrat des transglycosylases et transpeptidases (PBPs) et donc le ralentissement de la biosynthèse du peptidoglycane.

Les Ramoplanines sont capables de cibler toutes les variantes du lipide II, à condition qu'elles contiennent du pyrophosphate (Walker et al., 2005; Cudic et al., 2002). Plus précisément, ces antibiotiques reconnaissent la partie NAM-Ala-D-Glu-pyrophosphate retrouvée dans les deux intermédiaires lipidiques de synthèse de la paroi, le lipide I et le lipide II et s'y complexent (Fig.17). Ainsi, les ramoplanines possèdent plusieurs cibles différentes contenant une partie commune et peuvent inhiber plusieurs réactions dans une même voie de biosynthèse. On parle alors de dualité ou de pluralité fonctionnelle. En effet, ces antibiotiques peuvent d'une part se complexer au lipide I, rendant ce dernier inaccessible à l'enzyme MurG qui catalyse l'addition de l'UDP-NAG sur ce substrat afin de former le lipide II (Somner and Reynolds, 1990; Reynolds and Somner, 1990) et d'autre part se lier au lipide II, inhibant ainsi les réactions de transglycosylations permettant l'initiation de la polymérisation du peptidoglycane (Lo et al., 2001).

Les antibiotiques jouent également un rôle important dans la complexation du lipide II.

Les lantibiotiques de type A sont également un bon exemple de pluralité fonctionnelle. Comme nous l'avons vu précédemment, la nisine est capable de former des complexes de forte affinité avec le lipide II membranaire, puis de former des pores qui perméabilisent la membrane cytoplasmique(Brogden, 2005). De plus, cet antibiotique contient un motif appelé « cage à pyrophosphate » qui est capable de piéger le pyrophosphate du lipide II(Hsu et al., 2004). Ainsi, l'interaction de la nisine avec le lipide II entraîne la séquestration de ce dernier et inhibe fortement la synthèse de peptidoglycane de manière similaire aux glycopeptides et aux ramoplanines(Wiedemann et al., 2001). La nisine a également une action inhibitrice sur la formation de la paroi de la spore naissante(Pag and Sahl, 2002) et peut activer les autolysines chez les bactéries à Gram positif, ce qui engendre notamment la dégradation prématurée de la paroi formant le septum de division cellulaire(Bierbaum and Sahl, 1985).

Les lantibiotiques, de type B, comme la mersacidine ou l'actagardine, inhibent la synthèse de la paroi *via* une interaction avec le lipide II(Brötz et al., 1998). Contrairement à la nisine, cette interaction n'engendre pas la formation de pore, mais bloque les réactions de transglycosylation(Brötz et al., 1997). Ces antibiotiques ciblent spécifiquement le disaccharide NAM-NAG présent sur le lipide II et sont donc incapables de se lier au lipide I(Brötz et al., 1998).

Les lantibiotiques à deux composants sont intéressants car ils combinent les différents mécanismes d'action contre le lipide II grâce à deux peptides, l'un liée au ciblage du lipide II et l'autre à la formation de pores. Les données sur le mode d'action de ces peptides sont rares. L'exemple le mieux étudié est celui de la lacticine 3147, qui est composée des peptides A1 et A2. Sur la base de la ressemblance du peptide A1 à la mersacidine, il a été proposé que ce peptide interagisse avec le lipide II(Martin et al., 2004), entraînant l'inhibition de la formation de la paroi cellulaire. Mais, la pleine activité de ce système est atteinte seulement en présence du peptide A2. En effet, il semble que ce système à deux partenaires ait un mode d'action similaire à la nisine, c'est à dire qu'en premier lieu, le peptide A1 interagirait avec le lipide II, ce qui permettrait l'interaction du peptide A2 et entraînerait la formation de pores(Martin et al., 2004).

D'autres antibiotiques ont été décrits comme agissant sur le lipide II. C'est le cas des Mannopectimycines qui se lient spécifiquement au lipide II. Il a été suggéré que cette interaction est la principale cause de l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire(Ruzin et al., 2004). Enfin, les moenomycines imitent le pyrophosphate présent sur le lipide II et se lient

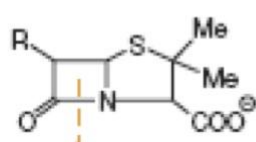
fortement avec le site utilisé lors de la réaction de transglycosylation effectuée par les PBPs(Lovering et al., 2007).

- L'inhibition du recyclage de l'undécaprénylpyrophosphate

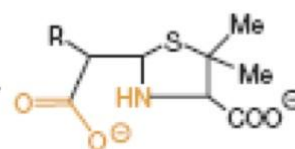
La bacitracine interagit spécifiquement avec l'undécaprénylpyrophosphate (UPP) et ainsi, inhibe sa déphosphorylation en undécaprénol-phosphate (UP) et donc la réutilisation de ce dernier dans la biosynthèse du peptidoglycane. Au cours de ma thèse je me suis principalement intéressée à cet antibiotique et nous reviendrons plus en détails sur celui-ci au cours de la dernière partie de l'introduction.

D'autres antibiotiques, comme l'amphomycine et la friulimicine, appartenant au groupe des antibiotiques lipopeptides, sont également capables de former un complexe avec l'UPP(Tanaka et al., 1979).

Anneau β -lactame intact



β -lactamase



Acide pénicilloïque
(inactif)

Fig.18 : Mécanisme d'inactivation des β -lactames par les β -lactamases.

L'hydrolyse de l'anneau β -lactame par les β -lactamases aboutit à l'ouverture de l'anneau, transformant l'antibiotique en sa forme inactive, l'acide pénicilloïque. Me, groupement méthyl.

D) Mécanismes et régulation de la résistance aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne

1) Diversité des mécanismes de résistances

On peut distinguer plusieurs types de mécanismes de résistances aux antibiotiques ciblant la paroi chez les bactéries. Certains ciblent directement l'antibiotique, le détruisent, l'inhibent ou le modifient, le rendant ainsi inefficace. D'autres agissent directement sur la cible de l'antibiotique, en la modifiant ou en la faisant disparaître, de sorte que l'antibiotique ne puisse plus interagir avec celle-ci. Enfin, le dernier mécanisme empêche la pénétration de l'antibiotique et donc son accès à sa cible, en modifiant la perméabilité de la membrane ou en utilisant des systèmes d'efflux. Un type de mécanisme de résistance peut être efficace contre plusieurs antibiotiques, et, inversement, des mécanismes différents peuvent être utilisés pour contrer l'action d'un même antibiotique.

a) Ciblage direct de l'antibiotique

Différentes stratégies sont utilisées pour cibler directement l'antibiotique. Certains mécanismes de résistances modifient l'antibiotique de façon intrinsèque pour le rendre inactif. D'autres séquestrent l'antibiotique ou le détruisent. D'autres, encore, modifient l'expression de ses gènes de synthèse, pour en diminuer la production.

Un des meilleurs exemples de mécanisme d'inactivation d'antibiotiques concerne les β -lactames, antibiotiques inhibant les réactions de transpeptidation lors de la synthèse de peptidoglycane. De nombreuses bactéries, aussi bien à Gram négatif qu'à Gram positif, synthétisent des β -lactamases qui sont capables d'hydrolyser l'anneau β -lactame de ces antibiotiques, conduisant à une conformation ouverte et inactive de l'antibiotique, l'acide pénicilloïque (Fig.18). Ces β -lactamases sont produites et sécrétées dans l'espace périplasmique et agissent donc sur l'antibiotique avant qu'il atteigne sa cible, les PBPs de la membrane cytoplasmique. Ce mécanisme d'action est très rapide et efficace, une seule molécule enzymatique pouvant hydrolyser jusqu'à 1000 molécules d'antibiotiques par seconde (Walsh, 2000). Les plus grands producteurs de β -lactamases sont les bactéries à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram positif les espèces *Staphylococci* et *Enterococci* en produisent également (Massova and Mobashery, 1998). Les gènes codant pour ces enzymes

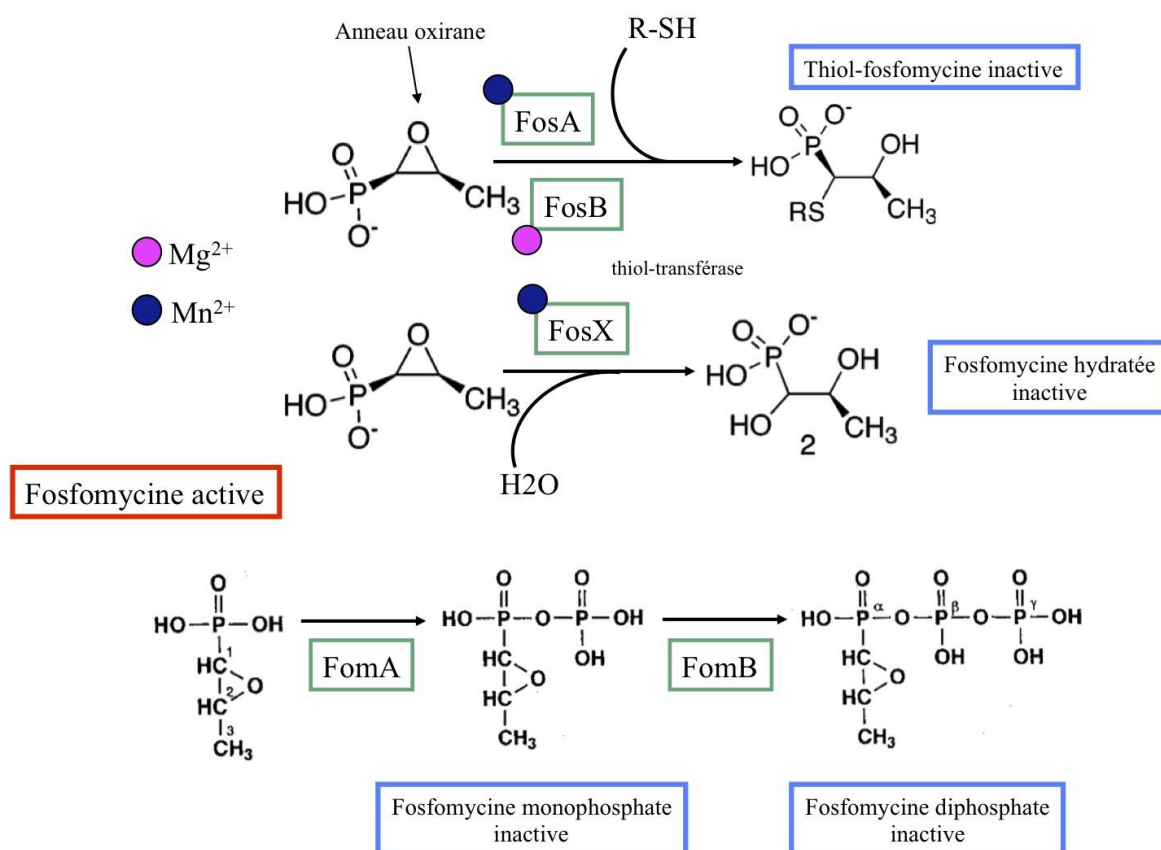


Fig.19 : Diversité des enzymes pouvant inactiver la fosfomycine.

Les enzymes de type FosA ou FosB sont des fosfomycine-thiol-transférases, pouvant inactiver la fosfomycine par ajout d'un groupement thiol au niveau de l'anneau oxirane de l'antibiotique. Les enzymes de type FosX inactivent l'antibiotique par hydratation. Les différents cofacteurs métalliques nécessaires à ces enzymes sont indiqués. Les enzymes FomA et FomB sont des kinases, qui catalysent la phosphorylation de la fosfomycine en fosfomycine monophosphate et phosphorylation de cette dernière en fosfomycine diphosphate, respectivement.

sont généralement exprimés à bas bruit, c'est le cas chez *E. coli* ou *Shigella spp.*, cependant, des mutations conduisant à l'augmentation de la synthèse de β -lactamases peuvent se produire (Normark et al., 1986). La production de ces enzymes peut être également induite notamment par des stress de la paroi ou la présence de β -lactames. En effet, chez plusieurs bactéries à Gram négatif comme *Enterobacter spp.*, *Morganella morganii*, *S. marcescens*, *Citrobacter freundii* et *P. aeruginosa*, la transcription du gène *ampC*, codant pour une β -lactamase est fortement induite, en présence de certains β -lactames, entraînant une forte production de cette enzyme (Lindberg and Normark, 1986).

La fosfomycine, antibiotique inhibant la formation de l'UDP-NAM à partir de l'UDP-GlcNac, est également la cible de mécanismes d'inactivation. En effet, plusieurs enzymes capables d'inactiver la fosfomycine par des modifications covalentes ont été identifiées. C'est le cas des kinases FormA/B (Kobayashi et al., 2000) et des fosfomycine-thiol-transférases FosA, FosB et FosX (Woodyer et al., 2006) (Fig.19). Ces dernières sont des métalloenzymes dont l'activité dépend d'un cofacteur métallique cationique. Les enzymes de type FosA sont des glutathiones-S-transférases et sont capables d'ajouter de la glutathione sur l'anneau oxirane de la fosfomycine, inactivant ainsi l'antibiotique (Bernat et al., 1997). L'activité catalytique de ces enzymes requiert la présence d'un ion manganèse (Mn^{2+}) (Rife et al., 2002). On retrouve ce type d'enzymes chez les bactéries à Gram négatif, comme *P. aeruginosa*, tandis que les bactéries à Gram positif, ne synthétisant pas de glutathione, possèdent des enzymes de type FosB. Ces dernières catalysent l'addition d'un résidu L-cystéine sur l'anneau oxirane de la fosfomycine (Suárez and Mendoza, 1991). Grâce à une comparaison des séquences primaires de FosA et FosB à celles déduites de nombreux génomes bactériens, un troisième type d'enzyme, nommé FosX, a été identifié chez de nombreuses espèces pathogènes comme *L. monocytogenes*. FosX catalyse l'inactivation de la fosfomycine par hydratation de l'anneau oxirane à l'aide du cofacteur métallique Mn^{2+} (Fillgrove et al., 2003). En plus de la famille FosA/B/X, une deuxième classe de protéines de résistances codées par le locus *fomA/B* a été caractérisée comme conférant une forte résistance à la fosfomycine dans les souches productrices (Kobayashi et al., 2000). Ces deux enzymes appartiennent à la grande famille des kinases et il a été montré que FomA catalyse la phosphorylation de la fosfomycine en fosfomycine monophosphate, tandis que FomB phosphoryle cette dernière en fosfomycine diphosphate. Ces enzymes transforment ainsi la fosfomycine en deux dérivés inactifs (Pakhomova et al., 2008).

D'autres mécanismes de résistance ont pour fonction de dégrader ou de séquestrer

l'antibiotique. De nombreuses bactéries peuvent synthétiser et sécréter de telles enzymes afin d'augmenter leur résistance à ces antibiotiques. Par exemple, les protéases V8 et l'auréolysine de *S. aureus*, ainsi que la protéase PgtE de la membrane externe de *Salmonella enterica* sont capables de cliver le peptide LL-37(Sieprawaska-Lupa et al., 2004; Guina et al., 2000). Cependant, d'autres antibiotiques peptidiques, ayant une structure renforcée par la présence de ponts disulfures, sont insensibles à ces protéases(Peschel and Sahl, 2006). Dans ce cas, certaines bactéries peuvent alors synthétiser des protéines capturant et séquestrant l'antibiotique, ce qui le détourne de sa cible. C'est le cas de *S. pyogenes* qui sécrète deux protéines de ce type : la protéine SIC (Streptococcal Inhibitor Complement) ayant pour cible les défensines et le LL-37(Frick et al., 2003) et la protéine M1 ayant pour cible le LL-37(Lauth et al., 2009).

Les antibiotiques sont également la cible de ce type de mécanisme. *B. subtilis*, qui produit et sécrète la subtiline, possède une protéine appelée SpaI capable de capturer cet antibiotique(Stein et al., 2005)et *L. lactis*, producteur de la nisine, met en jeu la protéine membranaire NisI séquestrant la nisine(Siegers and Entian, 1995).

b) Modification de la cible de l'antibiotique

Ce deuxième type de mécanisme de résistance vise directement la cible de l'antibiotique en la modifiant ou en la faisant disparaître, de sorte que l'antibiotique ne puisse plus interagir avec sa cible.

Un des mécanismes d'altération de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, le mieux étudié, concerne la résistance aux glycopeptides. Ces antibiotiques, dont fait partie la vancomycine, cible spécifiquement le dipeptide D-ala-D-ala présent sur le lipide II (Fig.17), entraînant une inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane. Le dipeptide D-ala-D-ala peut être modifié en D-ala-D-lac, présentant une très faible affinité pour les glycopeptides, conférant ainsi sa résistance à la bactérie(Arthur et al., 1992). La substitution d'un D-ala en D-lac est bien supporté par les enzymes impliquées dans les étapes suivantes de la biosynthèse du peptidoglycane, comme les transpeptidases, et par conséquent, ne modifie en rien la réticulation du peptidoglycane à la fin du cycle(Bouhss et al., 2002). Cinq gènes codent pour la machinerie enzymatique à la base de cette résistance(Arthur et al., 1993) et l'expression de ceux-ci est contrôlée par un système de régulation à deux composants codé

par les gènes *vanR* et *vanS*(Arthur et al., 1992). Ces gènes sont retrouvés chez de nombreux Entérocoques pathogènes et chez les *Actinomycetes* producteurs de glycopeptides(Marshall et al., 1997).

Les PBPs (Penicillin Binding Protein), cibles des β -lactames (Fig.17), peuvent également être modifiées pour devenir insensibles à ces antibiotiques. Ces PBPs, dites de faible affinité car elles présentent une affinité réduite pour les β -lactames, sont les produits de gènes mosaïques dans lesquels les séquences dites « sensibles » ont été substituées par des séquences dites « résistantes » aux β - lactames(Dowson et al., 1994). Chez *S. pneumoniae*, ces séquences mosaïques permettent la production de plus de 20 protéines PBPs différentes qui présentent des affinités faibles ou très faibles pour les β -lactames(Hakenbeck, 1995). Les PBPs de faible affinité sont retrouvées chez de nombreuses bactéries pathogènes, comme *S. pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus* possédants toutes deux une PBP capable d'assurer la polymérisation du peptidoglycane alors que les autres PBPs de la cellule sont inhibées par ces antibiotiques(Chambers, 1997; Muñoz et al., 1992).

Un exemple caractéristique de mécanisme aboutissant à la disparition de la cible de l'antibiotique concerne la résistance aux β -lactames. Chez *Enterococcus faecium*, une PBP, catalysant un nouveau type de transpeptidation de chaîne donatrice tétrapeptidique à partir du dipeptide L-lysyl-D-alanine, a été découverte(Mainardi et al., 2005). Cette PBP, appelée Ldt_{fm}, permet d'éviter l'étape classique de transpeptidation à partir du dipeptide D-ala-D-ala qui est une cible majeure des β -lactames. Cette protéine, complètement insensible à ces antibiotiques, prend donc le relais en leur présence.

L. monocytogenes a, elle, développé un système lui permettant de résister aux bactériocines de classe IIa qui forment des pores membranaires en interagissant avec la perméase à mannose du système PTS. Ce mécanisme permet, d'une part, de diminuer l'expression de la perméase cible(Vadyvaloo et al., 2004; Vadyvaloo et al., 2004) et d'autre part, d'augmenter l'expression d'autres perméases du système PTS, qui vont palier au manque de la première(Gravesen et al., 2002).

c) Diminution de la pénétration de l'antibiotique

Pour atteindre leur cible, certains antibiotiques doivent traverser la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif et la paroi chez les bactéries à Gram positif. Ainsi, il existe

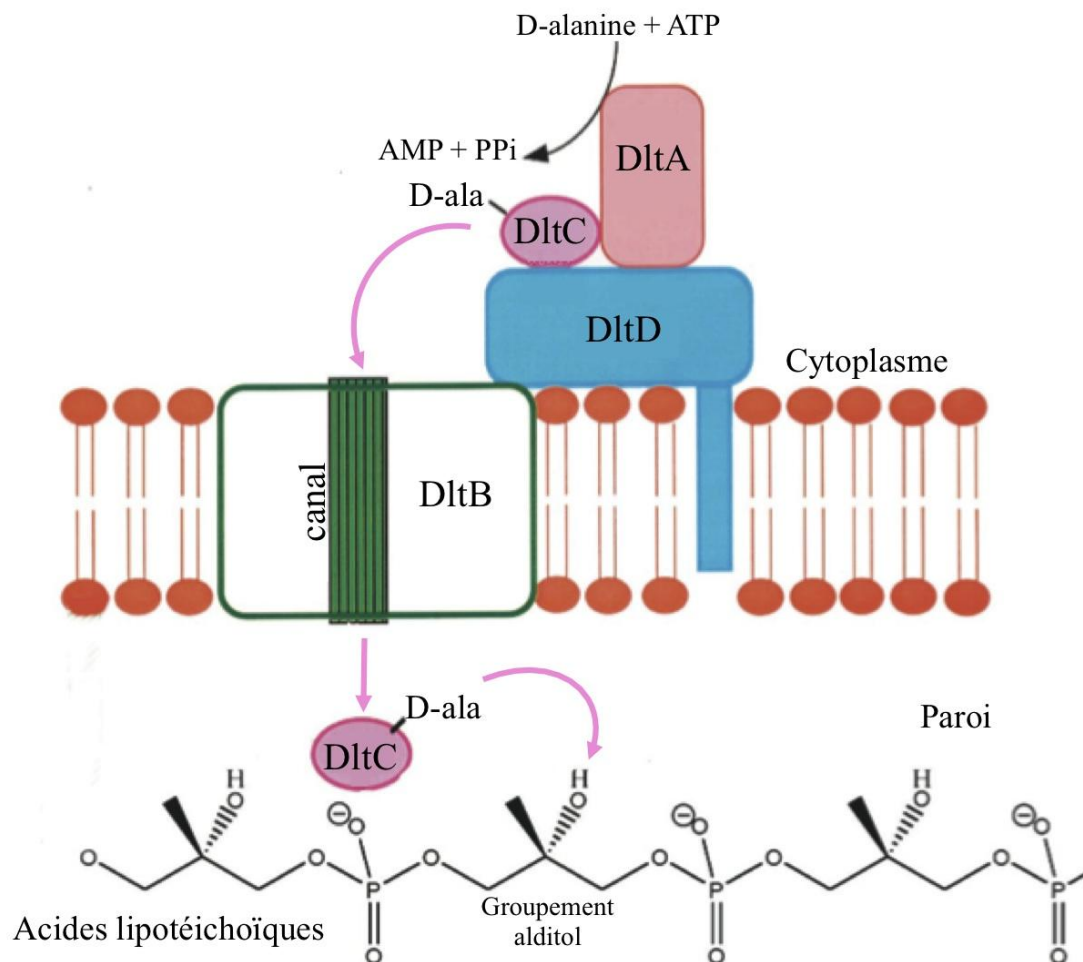


Fig.20 : D-alanylation des acides lipotéichoïques (ou téichoïques) et modification de la perméabilité de la paroi chez les bactéries à Gram positif.

La voie de D-alanylation des acides lipotéichoïques fait intervenir 4 protéines codées par l'opéron *dlt* trouvé dans les génomes de toutes les bactéries du groupe des Firmicutes . DltA, D-alanine-DltC ligase ; DltB, protéine de sécrétion du complexe DltC-D-alanine ; DltC, protéine « carrier » du résidu D-alanine ; DltD, D-alanine transférase. D'après (Neuhaus and Baddiley, 2003).

des mécanismes de résistance modifiant la perméabilité de ces différentes barrières et empêchant ainsi la pénétration de l'antibiotique jusqu'à sa cible.

Chez les bactéries à Gram négatif, la modification du lipide A (Fig.4) par ajout d'une chaîne acylée supplémentaire entraîne une rigidification de la membrane externe et donc une diminution de sa perméabilité. Ce mécanisme confère une résistance à plusieurs antibiotiques cationiques, comme le peptide antimicrobien humain LL-37(Bishop et al., 2000) ou la protégrine-1 produite par les leucocytes de porc(Guo et al., 1998). Les porines, présentes sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif, sont elles aussi utilisées pour empêcher la pénétration de l'antibiotique. En effet, ces porines s'ouvrent pour permettre des échanges de nutriments avec le milieu extérieur, mais cette ouverture permet à certains antibiotiques, comme les β -lactames, de franchir cette membrane et d'atteindre leur cible. Ainsi, les souches de *P. aeruginosa* ou de *Klebsiella pneumoniae* ayant perdu les gènes codant pour certaines de ces porines deviennent hautement résistantes aux β -lactames(Gootz, 2004; Jacoby et al., 2004).

Chez les bactéries à Gram positif, les antibiotiques peuvent en général franchir facilement les mailles de peptidoglycane. Certaines modifications de la paroi permettent de diminuer sa perméabilité. C'est le cas de l'ajout de résidus D-alanine au niveau des chaînes alditols des acides téichoïques et lipotéichoïques présents dans la paroi (Fig.4). Ce mécanisme de D-alanylation est médié par l'opéron *dlt*, présent dans tous les génomes des Firmicutes (Fig.20). Cet opéron est constitué de quatre gènes *dltABCD*. *dltA* code pour la ligase permettant d'activer le résidu D-alanine et de l'associer à la protéine DltC(Kleinkauf and Von Döhren, 1996). Cette protéine, dite « carrier » est codée par *dltC* et est capable de transporter le résidu D-alanine(Heaton and Neuhaus, 1994). *dltD* code pour une protéine ancrée à la membrane(Debabov et al., 2000), fixant DltC et facilitant ainsi l'interaction entre DltC et DltA lors de la fixation de la D-alanine(Neuhaus and Baddiley, 2003). Enfin, *dltB* code pour une protéine possédant 12 fragments transmembranaires et montrant une similarité de séquences avec les domaines hydrophobes des transporteurs ABC. Ainsi, le rôle de DltB semblerait être la formation d'un canal permettant le passage à travers la membrane du complexe DltC/D-alanine vers ses cibles, les acides téichoïques et lipotéichoïques(Neuhaus and Baddiley, 2003). L'augmentation du taux de D-alanylation du peptidoglycane est corrélée avec l'apparition de résistances à la nisine et à la gallidermine chez *S. pneumoniae*(Kovács et al., 2006), aux défensines et protégrines chez *S. aureus*(Peschel et al., 1999), aux bactériocines de classe IIa chez *L. monocytogenes*(Vadyvaloo et al., 2004), à la méthicilline chez *B. subtilis* et à la pénicilline chez *E. faecium*(Gutmann et al., 1996).

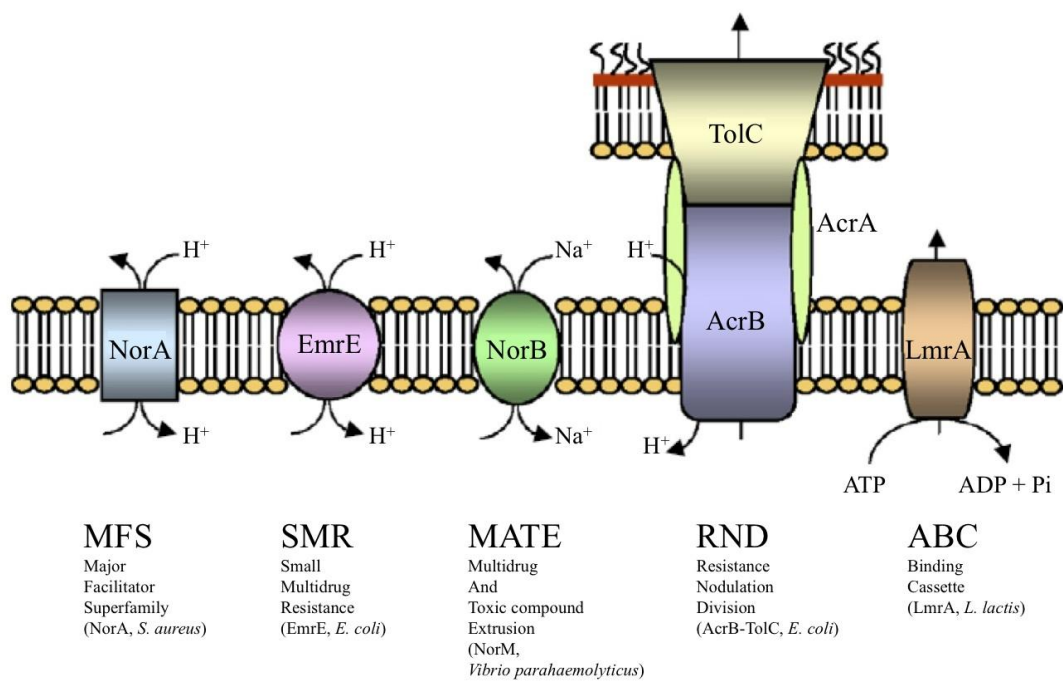


Fig.21 : Diversité des pompes d'efflux bactériennes impliquées dans la résistance aux antibiotiques. D'après (Kumar and Schweizer, 2005).

d) Les systèmes actifs d'efflux d'antibiotiques

Chez les procaryotes, de nombreux systèmes de transport assurent soit l'entrée (import) dans la cellule de nutriments essentiels, soit la sortie (export ou efflux) de substances toxiques. Les molécules transportées sont de composition très différente : sucres, acides aminés, lipides ou molécules plus complexes comme les antibiotiques. Les systèmes d'efflux jouent un rôle majeur dans la résistance aux antibiotiques, un seul de ces systèmes pouvant permettre une résistance simultanée à plusieurs antibiotiques (Li and Nikaido, 2004).

- La diversité des pompes d'efflux bactériennes

Les mécanismes d'efflux actifs font intervenir une grande variété de transporteurs membranaires répartis globalement en deux grandes familles (Fig.21). La première famille correspond aux transporteurs de type ABC (pour ATP Binding Cassette) qui confère une résistance à de nombreux antibiotiques *via* un mécanisme d'export ATP-dépendant (Fig.21). La résistance à la bacitracine est médiée par ce type de transporteur (Bernard et al., 2003), c'est la raison pour laquelle nous nous intéresserons plus particulièrement à cette famille.

La seconde famille utilise la force proton-motrice comme source d'énergie et est répartie en quatre classes en fonction des homologies de structure entre transporteurs : les MFS pour Major Facilitator Superfamily, les MATE pour Multidrug And Toxic compound Extrusion, la famille des SMR pour Small Multidrug Resistance et la famille des RND pour Resistance / Nodulation / Division (Fig.21).

Les transporteurs de la famille des MFS sont des antiporteurs semblant fonctionner en monomère. Chez les bactéries à Gram négatif, ces systèmes permettent une exportation efficace des substrats à travers les doubles membranes de ces bactéries. Chez les bactéries à Gram positif, il existe de nombreux systèmes de ce type, comme Bmr et Blt qui confèrent une multirésistance à *B. subtilis* ou NorA chez *S. aureus* (Li and Nikaido, 2004).

La famille MATE est représentée par NorM de *Vibrio parahaemolyticus* et confère une résistance à plusieurs agents cationiques toxiques, comme les fluoroquinolones. Ces transporteurs sont des antiporteurs dépendants d'un gradient ionique H^+ ou Na^+ (Kuroda and Tsuchiya, 2009).

La famille SMR est représentée par EmrE de *E. coli*, fonctionnant comme un homodimère(Jack et al., 2001). Cette famille contient plus de 250 membres, dont EbrAB de *B. subtilis*, un hétérodimère composé de deux polypeptides EbrA et EbrB(Kikukawa et al., 2007). Certains membres de cette famille confèrent une résistance aux aminoglycosides(Bay et al., 2008).

Les systèmes de la famille RND, fonctionnant comme des antiporteurs drogue/protons, sont particulièrement répandus chez les bactéries à Gram-négatif et catalysent l'efflux actif d'un grand nombre d'antibiotiques comme les fluoroquinolones ou les aminoglycosides. Ces transporteurs sont souvent couplés à des protéines de membrane externe comme c'est le cas des associations AcrAB/TolC chez *E. coli* ou MexAB/OprM chez *P. aeruginosa*. Les transporteurs RND forment des complexes tripartites. Ils possèdent de larges domaines périplasmiques (AcrB et MexB) reliés à la membrane interne par les protéines dites de fusion membranaires (ArcA et MexA) et à la membrane externe par des protéines de type OMP (Outer Membrane Protein) permettant le franchissement de celle-ci (TolC et OprM)(Nikaido and Takatsuka, 2009).

Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressée aux transporteurs de type ABC, capables d'effectuer un transport actif en hydrolysant l'ATP. Ces transporteurs sont présents dans tous les règnes du vivant, de la bactérie à l'homme(Higgins, 1992). Ils prennent en charge différents types de molécules qu'ils peuvent soit importer soit exporter(Ames et al., 1990) et sont ainsi impliqués dans de nombreux échanges avec le milieu extérieur. Un transporteur ABC est spécifique d'un composé ou d'un groupe de composés, appelé allocrite. Celui-ci ne subit aucune modification lors du transport qui est énergisé par l'hydrolyse de l'ATP en ADP, substrat réel du système.

Ces transporteurs peuvent être responsables de phénotypes de multi-résistance. C'est le cas de la protéine LmrA de *L. lactis* conférant des résistances multiples aux β -lactames, aux glycopeptides, aux aminoglycosides, aux quinolones, aux tétracyclines et enfin aux streptogramines(Putman et al., 2000). De nombreux exemples de mécanismes de résistance ciblant l'enveloppe bactérienne ont été caractérisés comme impliquant des transporteurs. C'est le cas de la résistance à la vancomycine assurée par les transporteurs VraFG de *S. aureus*(Meehl et al., 2007), de la résistance à la bacitracine par le transporteur BcrAB de *Bacillus licheniformis*(Neumüller et al., 2001) ou par le transporteur BceAB de *B. subtilis*(Bernard et al., 2003), ou encore de la résistance à la nisine par NisT chez *L. lactis*(Ra et al., 1996).

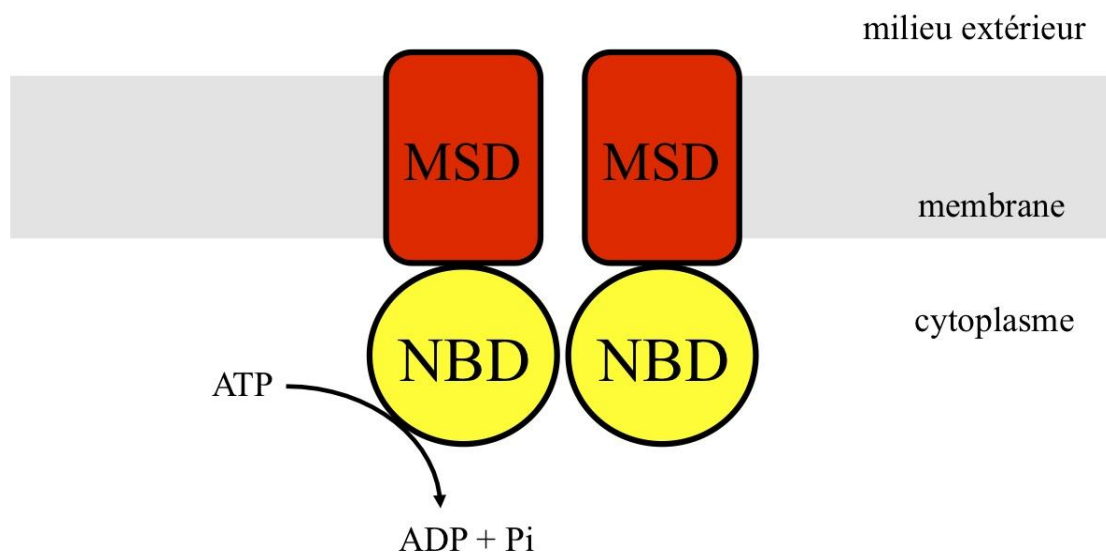


Fig.22 : Prototype d'un Transporteur ABC.

De façon classique, un transporteur ABC est composé, d'une part, de deux domaines hydrophobes membranaires nommés MSD pour Membrane Spanning Domain et qui forment la perméase membranaire, et d'autre part, de deux domaines hydrophiles nommés NBD pour Nucleotide Binding Domain et qui hydrolysent l'ATP pour énergiser le transport.

- Structure et fonctionnement des transporteurs ABC

Un transporteur ABC est composé de deux domaines distincts : un domaine hydrophobe transmembranaire, appelé MSD pour Membrane Spanning Domain, et un domaine hydrophile cytoplasmique associé de façon périphérique à la membrane et énergisant le transport en fixant et hydrolysant l'ATP, appelé NBD pour Nucleotide Binding Domain. La MSD est également appelée translocateur ou perméase, car cette sous-unité forme un pore dans la membrane, au travers duquel l'allocrite peut être transloqué. Le prototype d'un transporteur ABC est constitué de 4 domaines : deux domaines MSD et deux domaines NBD (Fig.22).

Cependant, il arrive que certains domaines NBD n'aient pas de partenaires MSD. Dans ce cas, ces NDB ne sont pas impliqués dans des mécanismes de transport, mais interviennent alors dans plusieurs processus cellulaires tels que la traduction(Tyzack et al., 2000), la synthèse du ribosome(Dong et al., 2004), la réparation de l'ADN et la ségrégation du chromosome(Hopfner and Tainer, 2003), la résistance au stress oxydatif(Nachin et al., 2003), ou encore la résistance aux antibiotiques(Kerr et al., 2005).

De plus, bien que les 4 domaines soient toujours présents dans un transporteur ABC fonctionnel, leur organisation varie du fait que les domaines NBD et MSD peuvent être codés par un ou plusieurs gènes. En effet, chez les procaryotes, il existe des structures présentant deux domaines fusionnés. C'est le cas de l'exporteur multidrogue Sav1866 de *S. aureus* composé de deux domaines NBD fusionnés(Dawson and Locher, 2006), ou de l'importeur de ferriochrome FhuBC d'*E.coli*, constitué de deux MSD fusionnés(Groeger and Köster, 1998), ou encore du transporteur LmrA de *L. lactis* composé d'un homodimère de deux modules correspondant chacun à la fusion d'un domaine NBD et d'un domaine MSD(van Veen et al., 2000).

Enfin, les transporteurs ABC peuvent parfois être accompagnés de protéines accessoires. Chez les importeurs, on trouve systématiquement une protéine nommée SBP (pour Substrate Binding Protein) ayant une affinité spécifique pour l'allocrite devant être importé et localisée dans le périplasme des bactéries à Gram négatif ou ancrée à la membrane plasmique des bactéries à Gram positif(Davidson et al., 2008). C'est le cas de l'importeur BtuCDF de la vitamine B12 chez *E.coli*, composé de deux MSD (BtuC), deux NBD (BtuD) et d'une SBD (BtuF) dont le rôle est de capturer la vitamine B12 dans le milieu extérieur(Rees et al., 2009). Les systèmes de sécrétion impliquant des transporteurs ABC sont également souvent accompagnés de protéines accessoires permettant à l'allocrite de franchir entièrement les barrières de l'enveloppe bactérienne. Ainsi, le système de sécrétion de type I associe les

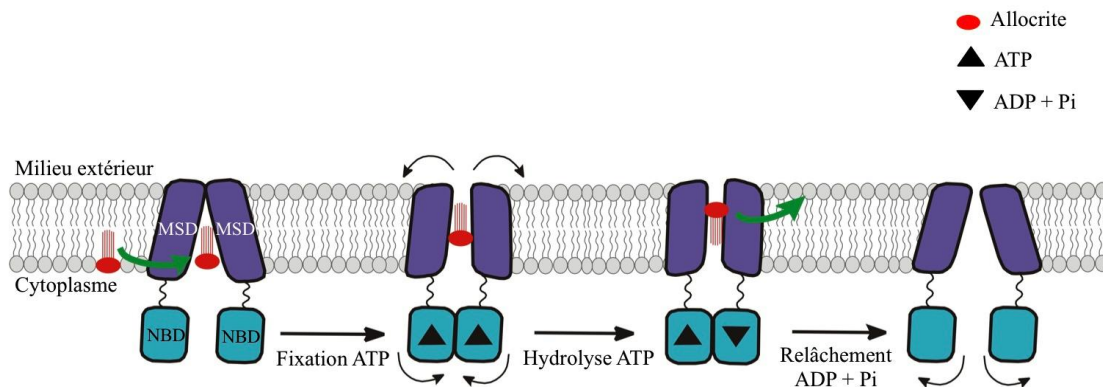


Fig.23 : Fonctionnement d'un transporteur ABC selon le modèle « Switch-ATP ».

(1) le mécanisme est activé par la liaison de l'allocrite sur le site de forte affinité du domaine MSD. Cela envoie un signal aux domaines NBD (communication aller) qui fixent l'ATP et forment un dimère fermé.

(2) Les changements conformationnels impliqués dans la formation de ce dimère fermé sont transmis aux domaines MSD (communication retour) qui subissent à leur tour un changement de conformation.

(3) Le site de liaison de l'allocrite perd son affinité et l'allocrite est relâché dans le milieu extérieur. L'ATP est hydrolysé, le transporteur se trouve dans un état intermédiaire où les domaines NBD sont fixés à l'ADP et au phosphate inorganique (Pi).

(4) Relâchement de l'ADP et du Pi qui permettent au transporteur de retrouver son état initial. Le site de liaison de l'allocrite retrouve sa forte affinité.

D'après (Dong et al., 2005).

transporteurs ABC avec des protéines de type MFP (Membrane Fusion Protein) et sont impliqués notamment dans la sécrétion de bactériocines de classe II chez les bactéries lactiques (Young and Holland, 1999).

Le mécanisme moléculaire du transport des transporteurs ABC n'a pas été complètement élucidé, mais les données biochimiques et structurales tendent à désigner un modèle selon lequel la liaison et l'hydrolyse de l'ATP seraient couplées à des changements conformationnels dans le transporteur, qui passerait d'une conformation ouverte (non lié à l'allocrite) vers une conformation fermée (transportant l'allocrite) et inversement (Davidson and Chen, 2004). Récemment, un modèle nommé « Switch-ATP » a été suggéré (Higgins and Linton, 2004). Ce modèle propose que la fixation et l'hydrolyse de l'ATP permettent un changement conformationnel des domaines NBD induisant à son tour un changement conformationnel des domaines MSD qui pourraient alors transloquer le substrat.

On peut distinguer 4 étapes principales dans ce modèle de mécanisme de transport (Fig.23) :

- 1) Le cycle de transport est initié par la fixation de l'allocrite sur un site de forte affinité présent au niveau des domaines MSD. Cette fixation engendre alors des changements conformationnels au niveau des domaines NBD. C'est ce qu'on appelle la communication « aller » (Sonveaux et al., 1999; Manciu et al., 2003).
- 2) Les changements conformationnels des domaines NBD permettent l'augmentation de l'affinité de ces domaines pour l'ATP. Un dimère « fermé » des domaines NBD est formé dans lequel deux molécules d'ATP sont insérées. La formation de ce dimère provoque alors un changement conformationnel important dans les domaines MSD, c'est la communication « retour ». Le site de fixation de l'allocrite perd son affinité et est alors relâché.
- 3) L'ATP est hydrolysé ce qui déstabilise le dimère fermé des domaines NBD. Le transporteur est alors dans un état transitoire où les domaines NBD sont fixés à l'ADP et au phosphate inorganique (Pi) et le site de fixation de l'allocrite est toujours de faible affinité (Urbatsch et al., 2003; Urbatsch *et al.*, 2003).
- 4) Il semble que seul le relâchement complet de l'ADP et du Pi permet au transporteur de retrouver son état initial dans lequel les domaines NBD sont en conformation ouverte et le site de fixation de l'allocrite retrouve son affinité maximale.

Pour expliquer le mécanisme d'efflux d'antibiotiques par les transporteurs ABC, deux modèles ont été proposés. Le modèle de type « flippase » propose que l'antibiotique soit

recruté au niveau du feuillet interne de la membrane puis transloqué dans le feuillet externe par un changement de conformation du transporteur. L'antibiotique peut alors diffuser dans le milieu externe (Higgins and Gottesman, 1992). Le modèle de type « vacuum cleaner » propose un rejet complet de l'antibiotique dans le milieu extérieur après recrutement dans la membrane (Gottesman and Pastan, 1993).

- Classification des transporteurs ABC

Les comparaisons de séquences des domaines NBD ont tout d'abord permis de mettre en évidence des motifs très conservés. C'est le cas des domaines de Walker A et B qui sont impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Walker et al., 1982), ou du motif Switch impliqué dans le couplage de l'hydrolyse et du transport (Schneider and Hunke, 1998).

Une étude similaire réalisée sur les domaines MSD montre que ces derniers sont beaucoup moins conservés. En effet, les MSD contiennent de 4 à 12 fragments transmembranaires qui ne jouent pas tous un rôle essentiel dans le transport (Blight et al., 1994). Les extrémités N et C-terminales des MSD sont cytoplasmiques. Chez les importeurs, un motif conservé nommé EAA a été caractérisé dans la boucle cytoplasmique à une centaine de résidus de l'extrémité C-terminale. Ce motif est impliqué dans l'interaction avec le domaine NBD du transporteur et présente de fortes conservations lorsqu'un même type d'allocrite est transporté (Saurin et al., 1994).

Le séquençage des génomes de plusieurs micro-organismes (*B. subtilis*, *E. coli* et *M. tuberculosis*) ont permis d'identifier l'ensemble des gènes codant pour des transporteurs ABC chez ces bactéries et d'établir une classification des transporteurs ABC en fonction de leur similarité de séquence. Ainsi, chez *B. subtilis*, 86 domaines NBD, 103 domaines MSD et 37 SBPs ont pu être identifiés et 78 transporteurs ABC, dont 38 importeurs et 40 exporteurs, ont pu être déterminés. Cette analyse, réalisée au laboratoire, a permis la classification de ces transporteurs en 11 sous-familles de domaines NBD (Fig.24) (Quentin et al., 1999). Chez *E. coli*, 10 sous-familles de domaines NBD ont été identifiées (Linton and Higgins, 1998) et chez *M. tuberculosis*, 11 sous-familles (Braibant et al., 2000). Les membres de chaque sous-famille semblent être impliqués dans l'import ou l'export d'allocrites de même nature, ce qui dans une certaine mesure, permet de faire des prédictions quant à l'allocrite pris en charge par des transporteurs ABC de fonction inconnue.

Chez *B. subtilis*, trois familles de domaines NBD apparaissent comme impliquées dans des systèmes d'efflux d'antibiotiques (Quentin et al., 1999) (banque de donnée ABCdb (An ABC transporter database), <http://www-abcdb.biotoul.fr/>) (Quentin and Fichant, 2000) (Fig.24) :

- la famille 6 rassemble globalement des transporteurs ABC impliqués dans les systèmes d'efflux d'antibiotiques chez les organismes producteurs de ces antibiotiques, comme le système SunT conférant la résistance à la sublancine. On trouve également dans cette sous-famille les exporteurs de type LmrA de *L. lactis* qui confèrent des phénotypes de multi-résistances. L'organisation des domaines de l'ensemble de ces transporteurs ABC est similaire à l'organisation des domaines de LmrA, avec le domaine NBD fusionné au domaine MSD.

- la famille 7 contient en particulier des transporteurs ABC à 4 domaines non fusionnés, qui semblent impliqués dans les mécanismes d'immunité aux antibiotiques

- la famille 9, enfin, rassemble des transporteurs ABC prédits comme étant des exporteurs et semblant impliqués dans des systèmes d'immunité (immunité à la salivaricine pour le transporteur SalTX) ou des systèmes de résistance aux antibiotiques. Cette famille contient trois transporteurs intéressants, dont nous reparlerons plus tard, le transporteur BceAB (anciennement YtsCD) impliqué dans la résistance à la bacitracine, et les transporteurs PsdAB (anciennement YvcRS) et YxdLM.

En conclusion, l'ensemble de ces mécanismes de résistance constitue pour les bactéries un arsenal de défense contre les antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne. Nous allons voir que les déterminants génétiques de ces résistances sont l'objet de mécanismes de régulations complexes permettant à la bactérie de répondre de façon coordonnée à la présence d'un antibiotique dans son environnement.

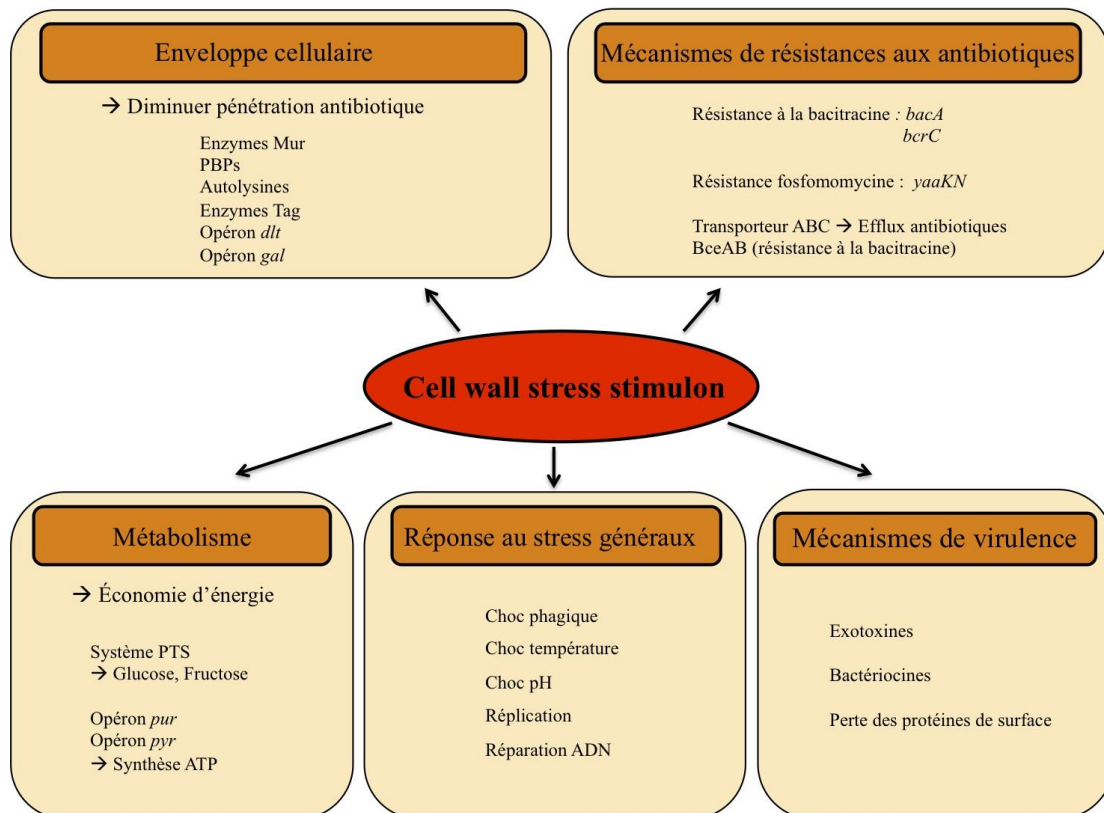


Fig.25 : Les différentes fonctions pouvant être induites par un « cell wall stress stimulon ».
D'après (Mascher et al., 2003; Pietiäinen et al., 2005; Utaida et al., 2003; Mongodin et al., 2003; McCallum et al., 2006; Kramer et al., 2006; Wecke et al., 2006).

2) Les mécanismes de régulation des gènes codant pour les systèmes de résistance aux antibiotiques ciblant la paroi

Comme nous l'avons vu, de nombreux mécanismes de résistances permettent la défense des bactéries contre les antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne. Ces mécanismes font l'objet d'une régulation complexe par différents systèmes de régulation que nous allons détailler ici.

a) Les « cell wall stress stimulon »

Mises en contact avec un antibiotique, les bactéries vont moduler l'expression de nombreux gènes intervenant dans la mise en place d'une réponse adaptée, leur permettant de survivre en dépit de la présence de cet agent toxique. Le stress de l'enveloppe (cell wall stress) engendré par la rencontre de l'antibiotique et de sa cible, la paroi, induit l'expression d'un groupe de gènes. L'ensemble des gènes répondant à un stimulus donné est appelé stimulon.

De nombreuses études portant sur ces stimulons ont été réalisées chez plusieurs Firmicutes grâce aux outils d'analyse globale tels que le transcriptome ou le protéome et révèlent un réseau de régulation complexe en réponse à la présence d'antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne. Les premières études de ce type ont été réalisées pour analyser la réponse de *B. subtilis* à la présence de bacitracine(Mascher et al., 2003) ou d'antibiotiques cationiques(Pietiäinen et al., 2005) et la réponse de *S. aureus* à plusieurs antibiotiques ciblant la paroi, l'oxacilline, la bacitracine, la D-cyclosérine(Utaida et al., 2003) et la vancomycine(Mongodin et al., 2003; McCallum et al., 2006). D'autres études ont été ensuite réalisées sur le stimulon induit par la présence de nisine chez *L. lactis*(Kramer et al., 2006) ou sur la réponse de *B. licheniformis* à la vancomycine et à la bacitracine(Wecke et al., 2006).

Ces différentes études ont montré que les « cell wall stress stimulons » correspondent à un grand nombre de gènes. Par exemple, en réponse à la vancomycine, chez *S. aureus*, on dénombre 69 gènes induits et 41 réprimés(McCallum et al., 2006). Ces gènes sont impliqués dans des fonctions très diverses (Fig.25).

Nombre des gènes induits codent pour des protéines dont les fonctions sont reliées à l'enveloppe bactérienne. Ce sont des enzymes impliquées dans la synthèse des constituants de la paroi, comme les PBPs, les autolysines et les enzymes Mur impliquées dans la synthèse de

peptidoglycane(Mongodin et al., 2003; Utaida et al., 2003; Pietiäinen et al., 2005; McCallum et al., 2006), les enzymes Tag impliquées dans la synthèse des acides téichoïques(Pietiäinen et al., 2005), ou encore les N-acétyl-Glucosamine-6P-isomérases qui optimisent le rendement de synthèse de ces constituants(Kramer et al., 2006). Ainsi, cet accroissement de la synthèse des constituants de la paroi va permettre aux Firmicutes de produire une paroi plus épaisse(Mongodin et al., 2003). De même des gènes codants pour des machineries de modification de la paroi vont être induits. C'est le cas de l'opéron *dlt* qui, comme nous l'avons vu précédemment, diminue la perméabilité de la paroi(Wecke et al., 2006), de l'opéron *gal* codant pour l'incorporation de résidus galactoses dans les acides lipotéichoïques augmentant ainsi leur rigidité(Kramer et al., 2006), l'opéron *cap* chez *S. aureus*, codant pour la production de polysaccharides dans la couche S de la paroi, réduisant notamment la pénétration des antibiotiques(Utaida et al., 2003). On retrouve également des gènes codant pour des enzymes de modifications de la membrane plasmique, comme l'augmentation du taux de cardiolipines membranaires (gène *ywiE* de *B. subtilis*), ou la diminution du taux d'acides gras saturés (répression de l'opéron *fab* de *L. lactis*). Ces mécanismes sont supposés densifier la membrane plasmique et réduire la pénétration d'antibiotiques cationiques et donc la formation de pores(Kramer et al., 2006; Pietiäinen et al., 2005). D'autre part, certains mécanismes de modification de l'enveloppe bactérienne peuvent aboutir à une augmentation du pH de surface. C'est le cas de la voie de dégradation de l'arginine, dont les enzymes sont codés par l'opéron *arc* et qui produit de l'ornithine, du dioxyde de carbone et de l'ammonium, tendant à augmenter le pH et ainsi, dégrader les antibiotiques cationiques ou permettre leur fixation à la paroi, empêchant l'antibiotique d'atteindre la membrane(Kramer et al., 2006).

En outre, les « cell wall stress stimulon » incluent des gènes impliqués dans divers mécanismes de résistances, comme ceux de résistance à la fosfomycine(Pietiäinen et al., 2005), à la bacitracine(Pietiäinen et al., 2005; Wecke et al., 2006) ou à la tétracycline(Kramer et al., 2006) et des gènes codant pour des transporteurs ABC. Beaucoup sont de fonctions inconnus, mais les auteurs de ces études ont supposé que la présence de ces transporteurs augmente probablement la capacité d'efflux d'antibiotiques des bactéries.

De nombreux gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire central sont également modulés dans les « cell wall stress stimulon ». Les mécanismes utilisés pour répondre au stress de l'enveloppe ont un coût énergétique que les bactéries doivent prendre en compte au niveau du métabolisme global d'économie d'énergie. Par exemple, chez *S. aureus*, en présence de vancomycine, les gènes codant pour les importeurs de composés sucrés du système PTS sont induits, permettant ainsi l'augmentation de l'apport de glucose ou de

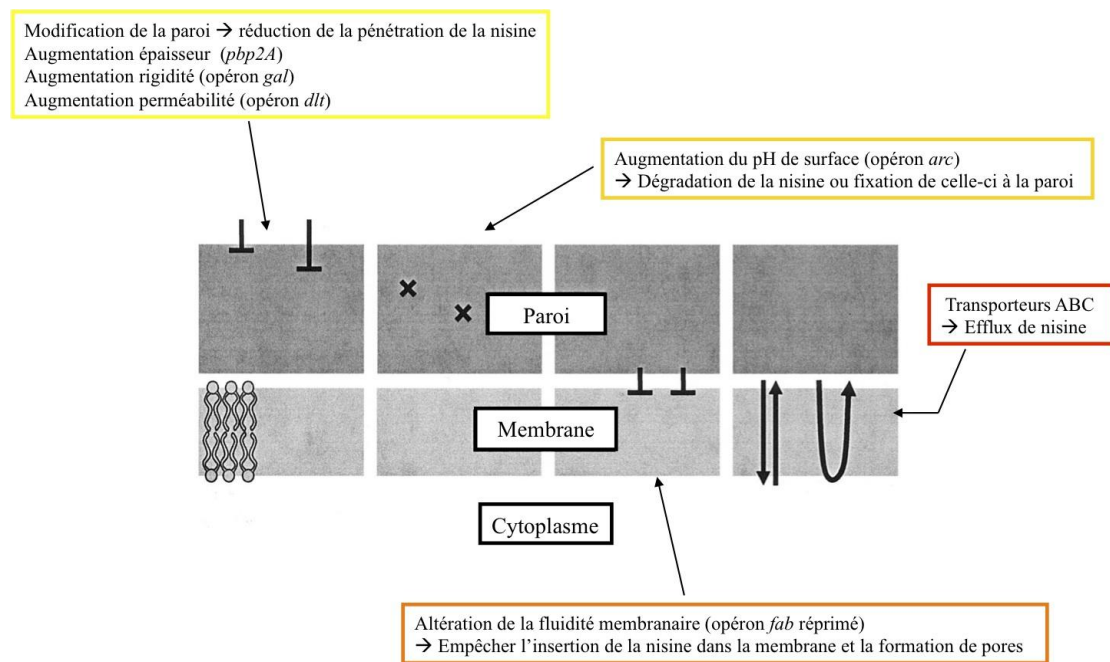


Fig.26 : Diversité des mécanismes mis en place par *L. lactis* lors de la réponse à la nisine.D'après (Kramer et al., 2006).

fructose nécessaire pour renouveler rapidement les constituants de la paroi(Mongodin et al., 2003). D'autre part, l'opéron *pur*, codant pour les enzymes de la biosynthèse des purines, est également fortement induit. Cette voie de biosynthèse est un mécanisme alternatif de synthèse d'AMP puis d'ATP, qui permet probablement de palier à la diminution de la quantité d'ATP normalement obtenue par glycolyse(Mongodin et al., 2003). Chez *B. licheniformis*, en présence de vancomycine et de bacitracine, on retrouve un mécanisme similaire, l'induction de l'opéron *pyr*, codant pour les enzymes de biosynthèse des pyrimidines(Wecke et al., 2006).

Des gènes impliqués dans des réponses adaptatives aux stress plus généraux sont également induits. Ainsi, des protéines répondant au choc phagique(Pietiäinen et al., 2005), au choc de température, comme DnaK(Kramer et al., 2006), ou au choc de pH(Utaida et al., 2003), et des protéines de réplication, comme les hélicases(Pietiäinen et al., 2005) ou les recombinaisons(McCallum et al., 2006), et de réparation de l'ADN, comme RadC(Pietiäinen et al., 2005) sont produites.

Par ailleurs, on observe l'induction de gènes impliqués dans des mécanismes de virulence chez *S. aureus* (production d'exotoxines, perte de protéines de surface, production de bactériocines), permettant à la bactérie de toucher à son tour les autres organismes présents dans sa niche écologique(Mongodin et al., 2003; McCallum et al., 2006).

En conclusion, les « cell wall stress stimulons » ont un impact fort sur la cellule en induisant des déterminants génétiques impliqués dans des fonctions diverses. Cependant, tous les mécanismes induits peuvent être reliés à une mise en place de la résistance à un antibiotique. Ceci est bien illustré par la résistance à la nisine chez une souche de *L. lactis* non-productrice de nisine (Fig.26).

Le grand nombre de gènes appartenant à ces stimulons suggère l'existence d'un réseau de systèmes de régulation (ou « network ») capable de détecter puis de répondre aux attaques de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne. Deux types de système de régulation ont été clairement identifiés comme participant à la détection de stress de la paroi : les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ou ECFs) et les phosphorelais (ou systèmes à deux composants, TCS).

b) Les facteurs sigmas à fonction extracytoplasmique ou ECFs

Lors de l'initiation de la transcription, l'ARN polymérase s'associe avec une protéine appelée le facteur sigma. Celui-ci joue un rôle essentiel dans la sélectivité de l'activité transcriptionnelle en permettant à la polymérase de se fixer de manière spécifique sur les promoteurs qu'elle transcrit. La substitution d'un facteur sigma par un autre peut rediriger une partie ou l'ensemble des ARN polymérases vers la transcription de gènes normalement silencieux.

Chez les bactéries, il existe deux types de facteurs sigmas : σ^{70} ou σ^{57} , qui diffèrent par leur structure et leur fonction (Gross et al., 1998). Les facteurs sigma de type σ^{70} sont divisés en cinq groupes. Les facteurs sigma du groupe 1, dont font partie le facteur σ^{70} d' *E. coli* et ses orthologues, sont dits « primaires » car ils sont essentiels aux bactéries. Ils participent à la majorité de l'activité de transcription durant la croissance exponentielle (Lonetto et al., 1992). Les autres groupes de facteurs sigma participent à des activités plus spécifiques, comme l'initiation de la transcription lors de stress généraux ou lors de la phase stationnaire de croissance. Plus spécifiquement, les facteurs sigma appartenant au groupe 4 sont impliqués en réponse à des stimuli extracytoplasmiques (tels que les chocs osmotiques, les chocs thermiques ou les stress de la paroi) et permettent la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans des fonctions extracytoplasmiques (Missiakos and Raina, 1998). Ils sont ainsi appelés les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique (ou ECFs).

A la suite du séquençage du génome de *B. subtilis*, sept ECFs ont été identifiés (Kunst et al., 1997). Certains de ces facteurs sigmas sont impliqués dans l'expression des gènes codant pour des mécanismes de résistance aux antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne. Par exemple, le gène codant pour le facteur σ^M , exprimé en début et jusqu'au milieu de la phase exponentielle de croissance (Thackray and Moir, 2003), est indispensable au maintien de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne dans diverses conditions de stress. Son expression est induite en présence d'une salinité élevée, d'un pH acide, d'éthanol et d'antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne comme la bacitracine, la vancomycine et la fosfomycine et enfin, lors de chocs thermiques (Thackray and Moir, 2003). Le régulon σ^M compte notamment le gène *bcrC*, codant pour une UPP phosphatase impliquée dans la résistance à la bacitracine.

Le gène codant pour le facteur σ^X , exprimé en fin de phase exponentielle, permet le contrôle des modifications au niveau de l'enveloppe bactérienne (Huang and Helmann, 1998). Son régulon contient l'opéron *dlt*, impliqué dans l'augmentation de la perméabilité membranaire (Fig.20), le gène *bcrC*, appartenant également au régulon σ^M , et le gène *pbpX*,

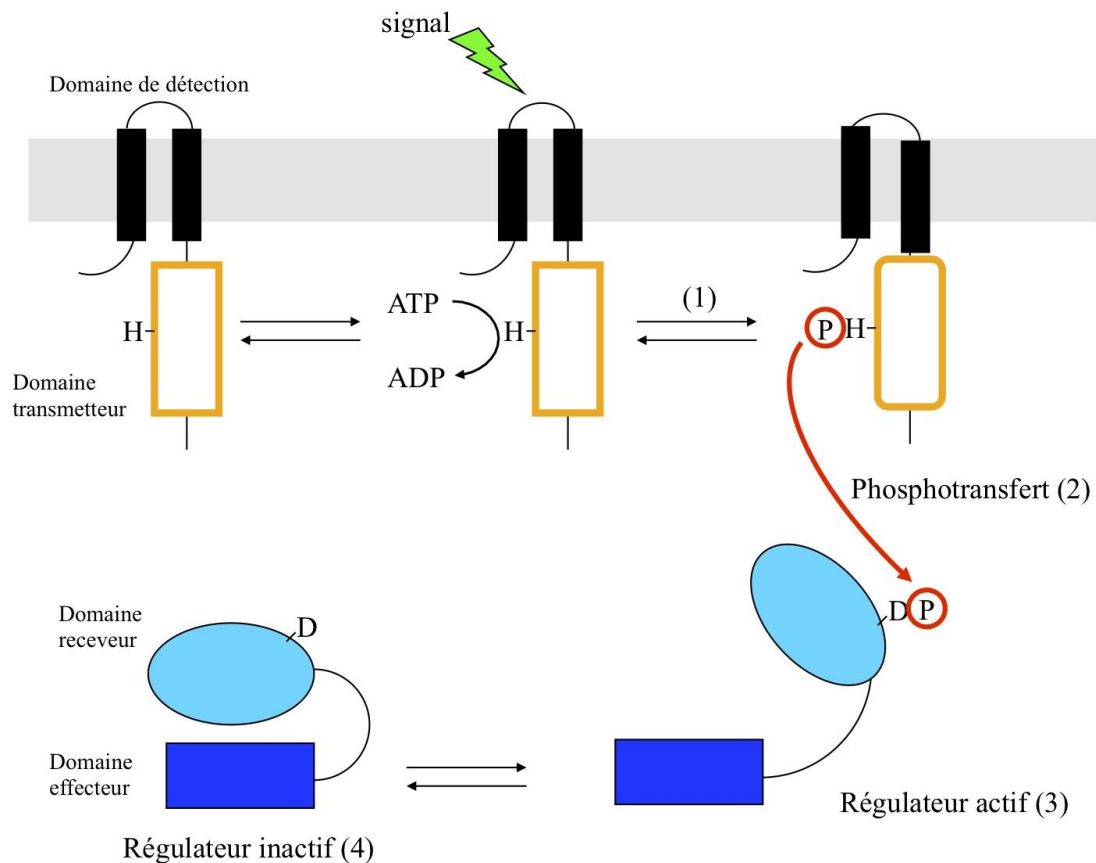


Fig.27 : Mécanisme de phosphotransfert d'un système de transmission du signal classique.

La transmission du signal fait intervenir 4 étapes successives :

(1) La perception du signal : le domaine de détection de l'histidine kinase perçoit le signal et entraîne une modification de conformation du senseur, conduisant à l'autophosphorylation du résidu histidine (H) conservé.

(2) Le phosphotransfert : le groupement phosphate (P) lié au résidu (H) est transféré sur un résidu aspartate (D) conservé du domaine receveur du régulateur de réponse.

(3) Activation du régulateur : la phosphorylation du domaine receveur provoque un changement de conformation du régulateur, activant son domaine effecteur. Le régulateur va alors pouvoir activer ou réprimer l'expression de ses gènes cibles.

(4) Réversibilité du système : en absence de signal, le régulateur actif peut revenir à son état inactif, soit en étant déphosphorylé grâce à une activité phosphatase qui lui est intrinsèque, soit par l'intervention d'une protéine phosphatase auxiliaire ou d'une activité phosphatase portée par le senseur.

codant pour une PBP.

Enfin, le régulon du facteur σ^W comprend plus de 50 gènes souvent impliqués dans des synthèses d'antibiotiques ou des mécanismes de défenses contre les antibiotiques ciblant l'enveloppe bactérienne. Ainsi, le facteur σ^W permet l'expression de *pbpE*, codant pour une PBP de bas poids moléculaire, *fosB* qui permet la résistance à la fosfomycine (Huang et al., 1999), ainsi que des gènes codant pour des transporteurs ABC de la sous-famille 6 supposés être impliqués dans l'efflux d'antibiotiques. L'expression de ce facteur sigma est, par ailleurs, induite par la présence de plusieurs antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi, comme la vancomycine, la céphalosporine C, la D-cyclosérine ou la fosfomycine (Cao et al., 2002).

Ces trois ECFs sont exprimés à trois stades de croissance successifs, ce qui explique les recouvrements observés d'une part, au niveau des inducteurs physiologiques de ces régulons : stress lié au maintien de l'intégrité membranaire, antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi et d'autre part, au niveau des gènes constituant les régulons, comme c'est le cas du gène *bcrC*.

c) les systèmes à deux composants

- Fonctionnement

Les phosphorelais de type His/Asp (transfert de phosphate d'un résidu histidine à un résidu aspartate) existent chez les procaryotes, les archaebactéries, les eucaryotes unicellulaires et les plantes (Grebe and Stock, 1999). Parmi, les phosphorelais bactériens, les systèmes dits à deux composants sont désignés comme étant les « yeux » d'un micro-organisme (Fabret et al., 1999) car ils permettent de détecter une variation de l'environnement et d'assurer la transmission du signal, grâce à une cascade de phosphorylations qui aboutit à une réponse cellulaire adaptée.

Pour les systèmes classiques, auxquels nous nous intéressons plus particulièrement, la détection du stimulus et l'initiation de la cascade de phosphorylations sont assurées par une protéine senseur, généralement membranaire, possédant un domaine de détection N-terminal, extra cytoplasmique, et un domaine cytoplasmique à activité histidine kinase, appelé domaine transmetteur (Stock et al., 1989). Le partenaire de l'histidine kinase est un régulateur de réponse, constitué d'un domaine contenant le site de phosphorylation, appelé domaine receveur, et d'un domaine C-terminal de fixation à l'ADN, assurant le contrôle de

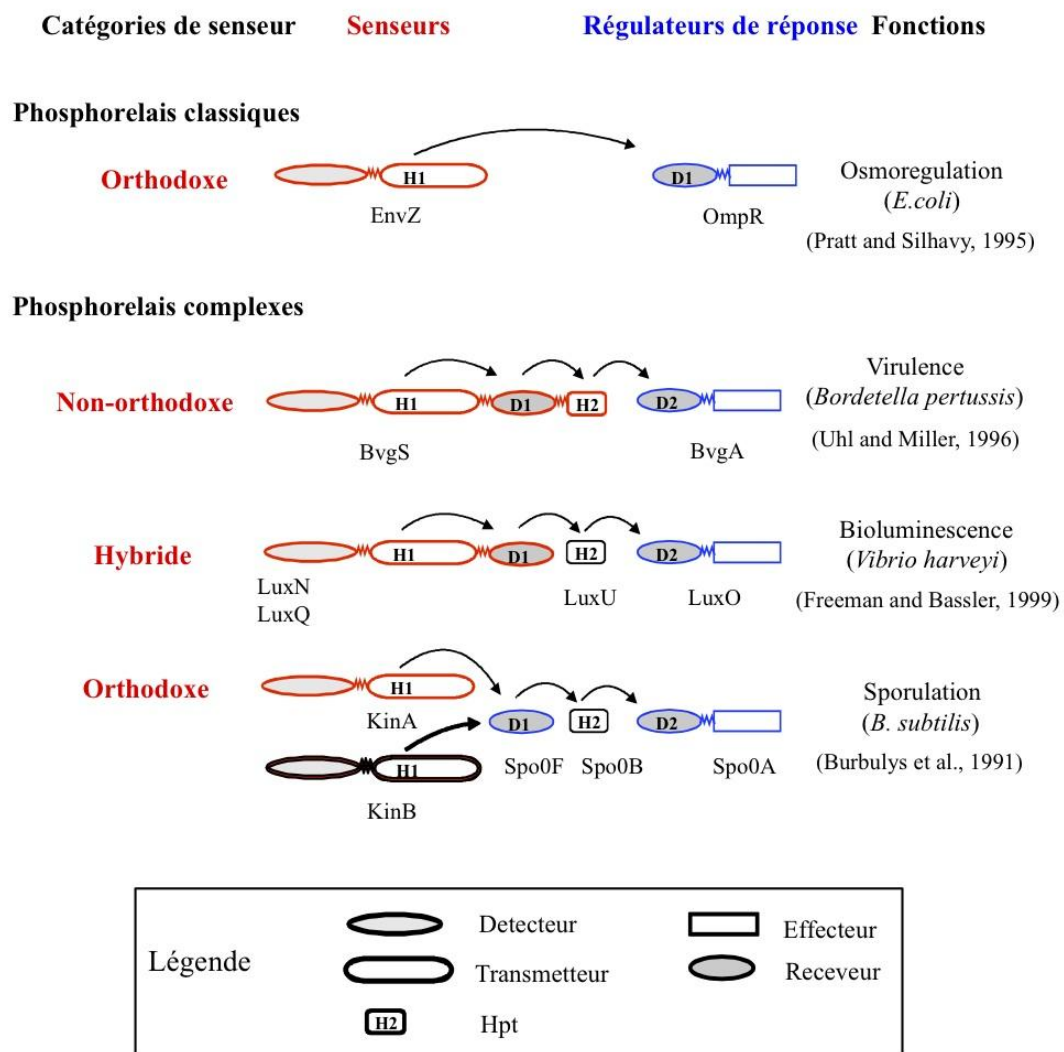


Fig.28 : Organisation des modules au sein des phosphorelais classiques et complexes.

l'expression des gènes cibles (Fig.27). L'exemple le plus caractéristique est le système EnvZ/OmpR impliqué dans l'osmorégulation chez *E.coli*(Pratt and Silhavy, 1995).

Il existe également des phosphorelais dits « complexes », se distinguant des phosphorelais classiques par leur organisation et le nombre d'étape de phosphorylation. En effet, les phosphorelais classique possède 1 domaine transmetteur sur les histidines kinases (H) et 1 domaine receveur sur le régulateur de réponse (D), alors que les phosphorelais complexes peuvent en comporter deux de chaque. Les phosphorelais complexes passent donc par quatre étapes de phosphorylation pour transmettre leur signal ce qui permet d'affiner la régulation(Perraud et al., 1999). Dans les systèmes complexes, suite à l'autophosphorylation du domaine H1, le phosphate est transféré sur un domaine alternatif D1, puis transmis au niveau d'un domaine alternatif H2 (également appelé Hpt pour Histidine Phosphotransfert) avant d'atteindre le domaine receveur D2 du régulateur de réponse (Fig.28).

On distingue alors 3 grands types de senseurs suivant le nombre de domaines qu'ils comportent. Les senseurs orthodoxes sont l'archétype d'un senseur classique, à deux domaines et peuvent être impliqués dans des phosphorelais classiques, comme EnvZ d'*E. coli*(Pratt and Silhavy, 1995), ou complexes, KinA et KinB de *B. subtilis*(Burbulys et al., 1991).

Les senseurs non-orthodoxes, en plus des domaines détecteur et transmetteur H1, possèdent un domaine receveur alternatif D1 suivi d'un domaine transmetteur alternatif H2. On peut citer comme exemples BvgS impliqué dans la régulation de la virulence chez *Bordetella pertussis*(Uhl and Miller, 1996), ou TorS impliqué dans la régulation du système respiratoire TMAO dépendant chez *E.coli*(Jourlin et al., 1996).

Les senseurs hybrides enfin sont très similaires aux senseurs non-orthodoxes à ceci près que leur domaine transmetteur alternatif H2 constitue un domaine séparé du senseur. On trouve ce type de senseur dans le système Lux de *V. harveyi*(Freeman and Bassler, 1999) mais également chez les eucaryotes avec le senseur Sln1 impliqué dans l'osmorégulation chez *Saccharomyces cerevisiae* (Xu and West, 1999).

- Caractéristique de la détection du signal

La détection du signal peut se faire selon trois grands modes : détection extracytoplasmique, détection cytoplasmique et détection membranaire (Fig.29).

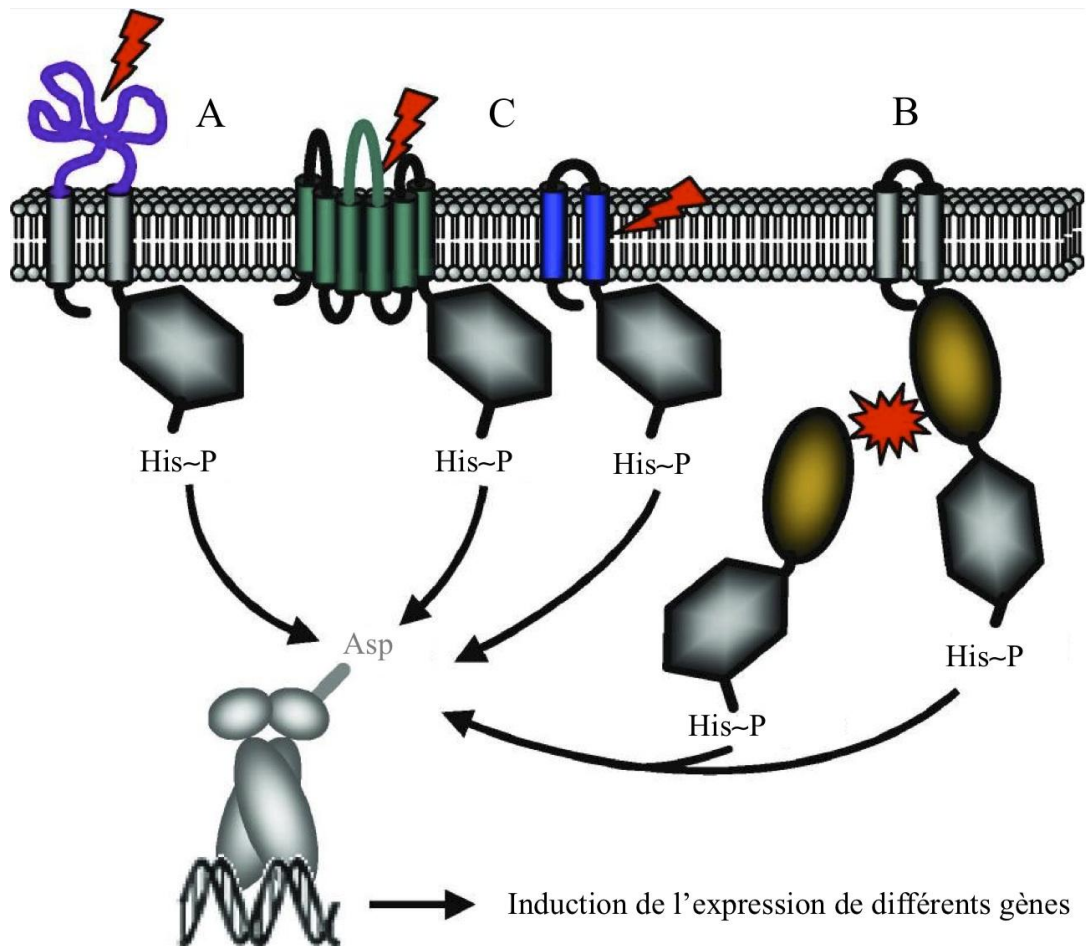


Fig.29 : Les trois mécanismes de perception du signal.

(A) Les senseurs à détection extracytoplasmique perçoivent le signal *via* une large boucle extracytoplasmique (en violet).

(B) Les senseurs à détection cytoplasmique détectent un signal cytoplasmique et peuvent être soit ancrés dans la membrane soit solubles dans le cytoplasme (en jaune).

(C) Les senseurs à détection membranaire perçoivent le signal *via* leurs hélices transmembranaires (en bleu) ou *via* leurs hélices transmembranaires combinées à des boucles extracytoplasmiques courtes (en vert).

Le stimulus est représenté en rouge.

Les senseurs à détection extracytoplasmique représentent le mode de détection classique et constituent le plus grand groupe de phosphorelais. Ils possèdent une large boucle extracytoplasmique, permettant la perception du signal, encadré par deux domaines transmembranaires, la partie de la protéine portant l'activité kinase étant située dans le cytoplasme (Mascher et al., 2006). Les senseurs tels que EnvZ impliqué dans la perception du changement de l'osmolarité extracellulaire chez *E. coli* (Pratt and Silhavy, 1995), PhoQ dont le rôle est important pour le contrôle de la pathogénicité chez *Salmonella typhimurium* (Guo et al., 1997), TorS, impliqué dans la détection du TMAO chez *E. coli* (Méjean et al., 1994) ou VirA contrôlant l'expression des facteurs de virulence chez *Agrobacterium tumefaciens* (Jin et al., 1990) appartiennent à ce groupe (Mascher et al., 2006).

Les senseurs à détection cytoplasmique correspondent au deuxième plus grand groupe de phosphorelais et peuvent détecter un signal cytoplasmique. Les senseurs de ce type peuvent être, soit ancrés dans la membrane avec un domaine de détection cytoplasmique en N- ou C-terminal, soit libres dans le cytoplasme (Mascher et al., 2006). Les senseurs ancrés à la membrane possèdent deux à quatre fragments transmembranaires sans boucle extracytoplasmique significative. Cette classe de senseurs détecte la présence de solutés cytoplasmiques ou de protéines de signalisation de l'état métabolique de la cellule, du développement de la cellule ou du cycle cellulaire. C'est le cas de KdpD qui contrôle, en cas de carence en potassium, la réponse adaptative de *E. coli* (Jung and Altendorf, 2002), ou du senseur d'oxygène, FixL, régulant la transcription des gènes de fixation de l'azote chez les bactéries symbiotiques *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhizobium meliloti* (Gerharz et al., 2003; Gilles-Gonzalez and Gonzalez, 1993).

Enfin, le troisième groupe de senseur contient des histidines kinase particulières, pouvant détecter des stimuli *via* leurs régions transmembranaires. Ces senseurs possèdent de deux à vingt fragments transmembranaires reliés par des segments intra ou extracellulaire très courts, ne pouvant, *a priori*, pas jouer le rôle de capteur. Par conséquent, le signal serait détecté soit au niveau de la surface interne ou externe de la membrane, soit à l'intérieur de la membrane, puis transféré au domaine kinase cytoplasmique (Mascher et al., 2006). Ces senseurs pourraient donc percevoir des stimuli comprenant des changements de propriétés de l'enveloppe cellulaire, des modifications des gradients d'ions ou électrochimiques, des processus de transport ou la présence de composés affectant l'intégrité membranaire.

Un groupe de senseurs particuliers impliqués dans la détection des antibiotiques ciblant la paroi peut être différencié. Ces senseurs, baptisés IM-HK (pour Intra Membrane-Histidine Kinase), se retrouvent pour la plupart chez les Firmicutes et possèdent deux domaines transmembranaires séparés par une boucle extracytoplasmique de moins de vingt-cinq acides aminés (Fig.29, en bleu)(Mascher, 2006). Deux grandes familles d'IM-HK peuvent être distinguées sur la base de leur similarité de séquence et du contexte génomique.

Les senseurs de la famille LiaS-like font partie d'un système à trois composants. Seuls deux membres de cette famille ont été décrits LiaS de *B. subtilis* et VraS de *S. aureus*(Mascher, 2006). Le gène codant pour le phosphorelais LiaSR font partie du stimulon induit par la bacitracine(Mascher et al., 2003) et sont également induits par d'autres antibiotiques interférant avec le lipide II, comme la nisine, la vancomycine ou la ramoplanine(Mascher et al., 2004). Le système à deux composants LiaSR possède un troisième partenaire, une protéine ancrée à la membrane, nommée LiaF, jouant le rôle d'inhibiteur du système(Wolf et al., 2010). Les gènes codant pour le système VraSR de *S. aureus* répondent à l'inhibition de la synthèse de la paroi et sont induits par la présence de plusieurs antibiotiques comme les glycopeptides, les β -lactames, la bacitracine et la D-cycloserine(Kuroda et al., 2003).

Les senseurs de la famille BceS-like sont liés par leur fonction et le contexte génomique à des transporteurs ABC(Joseph et al., 2002; Joseph et al., 2004; Mascher, 2006). En effet, les gènes codant pour ces senseurs et leurs régulateur de réponse associés (ils en ont chacun un) se trouvent en amont des gènes codant pour des transporteurs ABC. Ces derniers se trouvent sur un opéron distinct dont l'expression est activée par le phosphorelais. Ce lien génétique a été démontré pour trois systèmes chez *B. subtilis* : BceRSAB (anciennement YtsABCD), PcdRSAB (anciennement YvcPQRS) et YxdJKLM(Joseph et al., 2002). Le système BceRSAB de *B. subtilis* dont BceRS est le phosphorelais et BceAB le transporteur ABC, fonctionne de cette manière et confère la résistance à la bacitracine(Bernard et al., 2003; Mascher et al., 2003; Ohki et al., 2003; Bernard et al., 2007). Nous reviendrons plus en détails sur ce système, qui est au cœur de ma thèse, dans la troisième partie de l'introduction. De plus, les senseurs de type BceS-like appartiennent à la sous-famille IIIa définie chez *B. subtilis*(Fabret et al., 1999) et sont majoritairement couplés à des régulateurs de réponse de la sous-famille OmpR.

- Exemple de phosphorelais impliqués dans la régulation de mécanisme de résistances aux antibiotiques ciblant l'enveloppe

Les phosphorelais participent très souvent à la régulation de gènes impliqués dans des mécanismes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries(Stephenson and Hoch, 2002),mais dans la plupart des cas, le stimulus précis d'activation du phosphorelais reste inconnu.

Le phosphorelais VanSR régule l'expression des gènes *vanA* et *vanB* en réponse à la vancomycine chez *E. faecalis*. Ce phosphorelais est également impliqué dans l'expression de ses propres gènes de structure et semble indispensable à la régulation négative du système en absence de stimulus(Arthur and Quintiliani, 2001).

Le système plus global PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*, permet la régulation d'un grand nombre de gènes différents, à la fois impliqués dans la virulence de *S. enterica* chez la souris et l'homme(Bader et al., 2005) et dans des résistances aux antibiotiques, comme à la polymyxine et la magainine(Shi et al., 2004). En effet, certains produits des cibles de PhoP ont un rôle dans les modifications du lipopolysaccharides qui confèrent des résistances aux antibiotiques(Groisman et al., 1992).

D'autres systèmes à deux composants sont liés aux réseaux de régulation contrôlés par les facteurs sigma à fonction extracytoplasmique. C'est le cas de CseBC de *S. coelicolor* pouvant activer l'expression de ses propres gènes de structures et celui du facteur σ^E , dont le produit, à son tour, va entraîner l'expression de l'opéron *cwg* (Cell Wall Glycan) qui permet d'assurer l'intégrité de l'enveloppe(Hong et al., 2002).

En conclusion, les micro-organismes possèdent de nombreux mécanismes de régulation leur permettant de détecter la présence d'antibiotiques ayant pour cible l'enveloppe bactérienne, puis de moduler l'expression des gènes permettant d'adapter leur comportement face à ces antibiotiques (métabolisme, constitution de l'enveloppe, mécanisme de résistance). La complexité des réseaux de régulation observés à la suite d'un stress de l'enveloppe bactérienne rend difficile l'identification précise de chacun des stimuli activant les différents systèmes de régulation et la caractérisation des gènes de résistances spécifiques à un antibiotique.

III) La résistance à la bacitracine chez *B. subtilis*

A) *B. subtilis* et les Firmicutes

1) Le groupe des Firmicutes

B. subtilis est une bactérie à gram positif, appartenant au genre *Bacillus* qui fait partie de la branche des Firmicutes, autrement appelés groupe *Bacillus/Clostridium*, contenant exclusivement des bactéries avec un génome à faible pourcentage de G+C. Chez les Firmicutes, On peut distinguer par analyse phylogénétique trois classes différentes, à savoir, les *Bacilli* (regroupant les espèces de genre *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Listeria*), les *Clostridia*, et enfin les *Mollicutes* (espèces de genre *Mycoplasma*).

Outre de nombreuses bactéries non-cliniques et ubiquitaires, le groupe des Firmicutes contient de nombreux pathogènes comme *B. anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *Clostridium tetani* ou encore *S. pneumoniae*.

De plus, certains Firmicutes produisent des antibiotiques. Pour le seul genre *Bacillus* par exemple, on distingue un très grand nombre d'antibiotiques différents (Tagg et al., 1976). C'est le cas de *B. licheniformis* qui synthétise la bacitracine et la lichenysine (Froyshov and Laland, 1974; Konz et al., 1999) ou de *B. brevis* qui produit la gramicidine S et la tyrocidine (Figenschou et al., 1967; Mootz and Marahiel, 1997). De la même manière, les bactéries de genre *Streptococcus* et *Entérocooccus* synthétisent de nombreux antibiotiques comme la nisine, la salivaricine ou diverses entérocoines (Nes et al., 2007).

2) *B. subtilis*, une bactérie « modèle »

B. subtilis est un organisme ubiquitaire que l'on peut trouver préférentiellement dans le sol au voisinage des plantes, mais également dans certains écosystèmes marins ou encore dans l'appareil digestif des animaux. Le génome de *B. subtilis* est le premier d'une bactérie à gram positif à avoir été séquencé (Kunst et al., 1997). Non pathogène pour l'homme, c'est un organisme pour lequel de nombreux outils génétiques sont disponibles, facilitant ainsi sa manipulation. Il est utilisé comme modèle pour l'étude de bactéries pathogènes telles que *S*

aureus, *S. pneumoniae*, *B. anthracis* ou encore *L. monocytogenes*. La recherche industrielle s'intéresse elle aussi à *B. subtilis* car cette bactérie est source d'enzymes d'intérêts telles que les amylases, utilisées dans l'industrie du pain, ou encore les protéases et les cellulases, dans l'industrie des détergents. Cet organisme est également étudié dans le domaine pharmaceutique pour sa capacité à produire des antibiotiques, comme la bacitracine(Azevedo et al., 1993) ou la subtilosine(Babasaki et al., 1985), la fengycine(Chen et al., 1995), la mycosubtiline(Duitman et al., 1999) ou encore la surfactine(Cosmina et al., 1993).

Une particularité de *B. subtilis* est sa faculté d'adaptation à divers environnements. En effet, cette bactérie est capable de vivre dans différents écosystèmes et de survivre dans des conditions extrêmes. Pour cela, différents systèmes, lui permettant de s'adapter au milieu, existent chez cette bactérie. *B. subtilis* est naturellement compétente, ce qui lui permet de capturer de l'ADN étranger. La captation d'un ADN étranger peut constituer une source de nucléotides et également permettre à la bactérie d'acquérir de nouveaux gènes. Dans des conditions défavorables de croissance, elle est capable de se différencier en spores hautement résistantes, qui pourront reprendre leur croissance quand l'environnement sera redevenu favorable. Dans ce cadre, il est important pour la bactérie de détecter des variations environnementales mais également de pouvoir échanger des substances avec le milieu extérieur. Dans ce contexte, *B. subtilis* dispose d'une multiplicité de phosphorelais et de transporteurs, dont un nombre important de transporteurs de type ABC, qui lui permettent de mettre en place une réponse adaptée aux changements de l'environnement d'une façon rapide et efficace. Par exemple, un tel mécanisme est employé par *B. subtilis* pour détecter la présence de bacitracine et activer les gènes codant pour un système de résistance.

B) Bacitracine

La bacitracine a surtout été utilisée, en médecine clinique dans les traitements d'infections oculaires et chez les patients atteints de brûlure(Kanof, 1970), mais elle est inefficace dans la plupart des traitements contre les infections graves comme celles causées par les pathogènes nosocomiaux de type Entérocoques(Mondy et al., 2001). Plusieurs souches pathogènes sont résistantes à la bacitracine, c'est le cas des Enterocoques(McGowan et al., 2006), de *Listeria spp.*(Li et al., 2007), de *C. difficile*(Bourgault et al., 2006), ou encore de *S. Aureus* (Matsuo et al., 2010) (Yoshida et al., 2011) (Kolar et al., 2011) (Blake et al., 2011).

1) Biosynthèse

Cet antibiotique à branche cyclique est un dodécapeptide synthétisé de façon non-ribosomique par *B. licheniformis* et *B. subtilis* (Haavik and Froyshov, 1975; Azevedo et al., 1993). Notons, cependant, que la souche de *B. subtilis* utilisée au laboratoire ne le produit pas.

La synthèse de la bacitracine est réalisée par un complexe multienzymatique de type NRSP (Fig.14). Chez *B. licheniformis*, le cluster de gènes de biosynthèse de la bacitracine comprend le gène *bacT* codant pour une thioestérase, permettant les liaisons thioesters des résidus aminoacides à chaque module de trois peptides synthases, *bacA*, *bacB*, et *bacC*, dont les produits permettent l'assemblage des 12 aminoacides de l'antibiotique (Eppelmann et al., 2001). La première peptide synthase, codée par *bacA*, permet la formation de l'anneau thiazoline, essentiel à l'activité de l'antibiotique, à partir des deux premiers résidus isoleucine et cystéine. La troisième peptide synthase, codée par *bacC*, permet la cyclisation de la molécule entre le résidu asparagine et le résidu lysine (Fig.30).

La bacitracine est produite sous une multitude de formes plus ou moins actives, la bacitracine A étant la molécule ayant l'activité antibiotique la plus forte. On distingue par exemple les bacitracines B1, B2 et B3 qui ont globalement la même séquence que la bacitracine A mais, les résidus isoleucinyl y sont substitués par des résidus valine (Ming and Epperson, 2002).

2) Mode d'action

La bacitracine cible l'enveloppe bactérienne et inhibe une étape tardive de la voie de biosynthèse du peptidoglycane : la régénération de l'undécaprénylphosphate (UP), le translocateur lipidique membranaire des précurseurs de peptidoglycane (voir partie II) (Fig.17). La bacitracine est capable de se complexer à l'undécaprénylpyrophosphate (UPP) formé après libération du monomère de peptidoglycane (Fig.31). Ce complexe affecte drastiquement l'accessibilité de l'UPP aux phosphatases qui le déphosphorylent. Ainsi, la régénération de l'UP, étape finale de la biosynthèse de peptidoglycane, est bloquée. Le pool cellulaire d'UP diminue et ne permet plus un rendement suffisant de translocation de nouveaux précurseurs monomériques de peptidoglycane et la voie de biosynthèse est rapidement stoppée (Siewert and Strominger, 1967). Cette action spécifique de la bacitracine se traduit par un effet bactériostatique à faibles concentrations et bactériolytique à fortes

concentrations.

La bacitracine interagit spécifiquement avec le groupement pyrophosphate de l'UPP et la constante de dissociation du complexe est de l'ordre de 10^{-6} M^{-1} (Stone and Strominger, 1971). Cette interaction dépend de la présence d'un cation divalent, comme Mg^{2+} et Zn^{2+} , qui établit un pont entre les deux charges négatives du groupement pyrophosphate et la bacitracine. Le cation divalent se fixe sur l'anneau de thiazoline de la bacitracine, permettant le rapprochement des résidus Ile5 et Phe9, qui forment ainsi une surface hydrophobe certainement impliquée dans l'interaction de la bacitracine avec la chaîne hydrophobe de l'undécaprénylpyrophosphate (Epperson and Ming, 2001; Ming and Epperson, 2002).

La bacitracine peut également interagir avec d'autres molécules de la famille des polyisoprénylpyrophosphates, suggérant qu'elle puisse interférer avec d'autres voies métaboliques impliquant ces molécules en plus de la biosynthèse de peptidoglycane. Il a en effet été montré, d'une part, que la bacitracine inhibe la synthèse des squalènes et des stérols des cellules eucaryotes de foie de rat (Hancock and Fitz-James, 1964) et d'autre part, la synthèse des ubiquinones des cellules eucaryotes de mammifères et des cellules bactériennes (Schechter et al., 1972). Ces propriétés font que la bacitracine présente une toxicité importante sur les cellules humaines et est donc assez peu utilisée aujourd'hui dans les traitements médicaux.

C) Résistance à la bacitracine chez *B. subtilis*

L'analyse du transcriptome de *B. subtilis* en réponse à la bacitracine a montré l'induction de gènes impliqués dans plusieurs mécanismes de résistance (Mascher et al., 2003). Parmi ces mécanismes, on peut relever des UPP phosphatases, protéines membranaires de type BcrC, qui apportent un certain niveau de résistance à la bacitracine en entraînant une modification de la cible de l'antibiotique, c'est-à-dire l'UPP. En plus de ces protéines, *B. subtilis* possède un autre système de résistance bien plus efficace, le système BceRSAB. Il comprend un système de régulation à deux composants et un système de transport de type ABC dont l'expression des gènes est induite en présence de bacitracine.

1) L'UPP phosphatase BcrC

Cette protéine anciennement appelé YwoA, est un orthologue de BcrC_B de *B. licheniformis* et BcrC_{Ec} (anciennement YbjG) d'*E. coli* qui ont été identifiées comme participant à l'immunité à la bacitracine (Podlesek et al., 1995). BcrC est une chaîne peptidique de 193 aminoacides prédite comme membranaire car possédant potentiellement 4 fragments transmembranaires similairement à ses orthologues. Par homologie au système de résistance de *B. licheniformis*, BcrC avait été prédite comme étant un domaine MSD de transporteur ABC potentiel exportant la bacitracine (Podlesek et al., 2000; Ohki et al., 2003). Cependant, la séquence protéique de la protéine BcrC présente une signature caractéristique de la famille des protéines phosphatases de type PAP₂ et il en est de même pour ses orthologues (Bernard et al., 2003). Ainsi, BcrC participe bien à la résistance à la bacitracine, mais non pas en tant que partenaire MSD potentiel d'un transporteur ABC, mais en tant que phosphatase permettant de déphosphoryler l'undécaprénylpyrophosphate (ou UPP), cible de la bacitracine. De ce fait, BcrC est en compétition avec la bacitracine pour sa cible, l'UPP. BcrC est la première protéine à activité UPP phosphatase de la sous-famille PAP₂ chez *B. subtilis* à avoir été caractérisée (Bernard et al., 2005). Par ailleurs, le gène *bcrC* est transcrit par l'ARN polymérase contenant un des deux facteurs sigma à fonction extracytoplasmique, σ^M ou σ^X , dont l'un, σ^M , voit l'expression de son gène induite en présence de bacitracine (Cao and Helmann, 2002; Ohki et al., 2003; Mascher et al., 2003). Notre équipe a identifié deux autres UPP phosphatase, YubB et YodM, chez *B. subtilis*. YubB ne semble pas intervenir dans la résistance à la bacitracine et YodM n'a pas encore été testée.

Bien que participant à la résistance à la bacitracine, BcrC seule ne permet pas une résistance optimale. En effet, lorsque le gène codant pour BcrC est délété, le niveau de sensibilité de la souche à la bacitracine diminue par rapport à la souche sauvage, mais reste néanmoins très élevé (Bernard et al., 2003), révélant la présence d'un autre mécanisme important de résistance à la bacitracine.

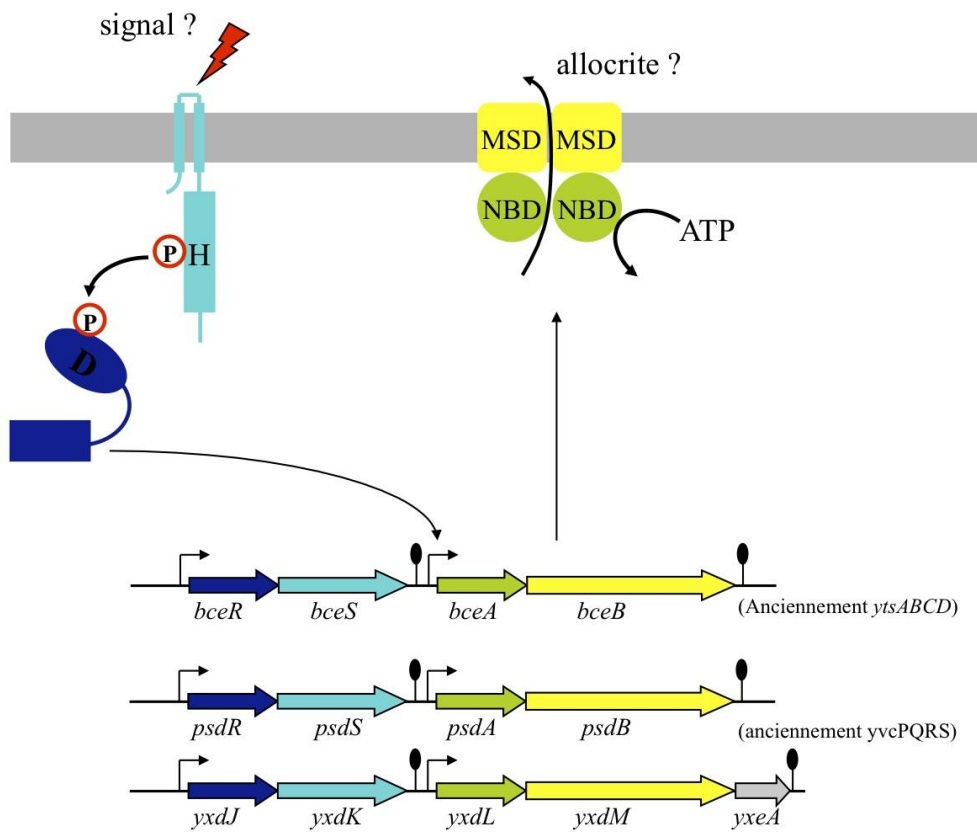


Fig.32 : Organisation des gènes des loci *bce*, *psd* et *yxd*.

Les flèches colorées indiquent le sens de transcription.

▢ promoteur putatif ; | terminateurs ρ -indépendant putatifs.

2) Le système BceRSAB

Le système BceRSAB est composé d'un phosphorelais du groupe IIIA (BceRS) et un transporteur ABC de la famille 9 (BceAB). Un couplage fonctionnel et génétique permet à ces deux entités de fonctionner ensemble pour conférer la résistance à la bacitracine.

a) Proximité génétique et couplage fonctionnel

Le recensement de tous les systèmes de transmission du signal et des transporteurs ABC de *B. subtilis* a permis de réaliser des études de localisation génétique de leurs gènes de structure (Joseph et al., 2002). Une proximité entre les gènes codant pour des ABC transporteurs de la famille 9 et ceux codant pour des phosphorelais appartenant à la famille IIIA (OmpR) a été mise en évidence au laboratoire. Cette proximité génétique semble être majoritairement observée chez les Firmicutes, bactéries à faible taux de G + C du groupe *Bacillus*/*Clostridium*. Pour trois de ces systèmes phosphorelais/transporteur ABC, BceRSAB (anciennement YtsABCD), PsdRSAB (anciennement YvcPQRS) et YxdJKLM, un couplage fonctionnel entre les deux entités avait été démontré (Fig.32). En effet, chaque régulateur de réponse du système de transmission (BceR, PsdR ou YxdJ) pouvait activer l'expression des gènes codant pour le transporteur ABC (BceAB, PsdAB ou YxdLM). De plus, il avait été montré que ce contrôle était direct, le régulateur de réponse interagissant avec la séquence promotrice en amont des gènes du transporteur ABC (Ohki et al., 2003; Joseph et al., 2004; Ohki et al., 2003).

Chacun des systèmes à deux composants présente les caractéristiques d'un phosphorelais classique avec une cascade de phosphorylation à deux étapes tandis que les transporteurs ABC sont des homo-dimères {MSD-NBD}₂. Comme aucun gène codant pour une protéine auxiliaire (Solute Binding Protein de transporteur ABC de type importeur, ou MFP associée à certains exporteurs) n'a été identifié dans le voisinage de ces loci, ces trois transporteurs sont prédits pour exercer des fonctions d'export.

D'autre part, les gènes codant pour ces trois systèmes sont induits par la présence d'antibiotiques ciblant la paroi, *bceAB* par la bacitracine (Bernard et al., 2003), *psdAB* par l'enduracidine, la nisine et la gallidermine (Rukmana et al., 2009; Staroń et al., 2011) et *yxdLM* par le peptide cationique antimicrobien LL-37 (Pietiäinen et al., 2005).

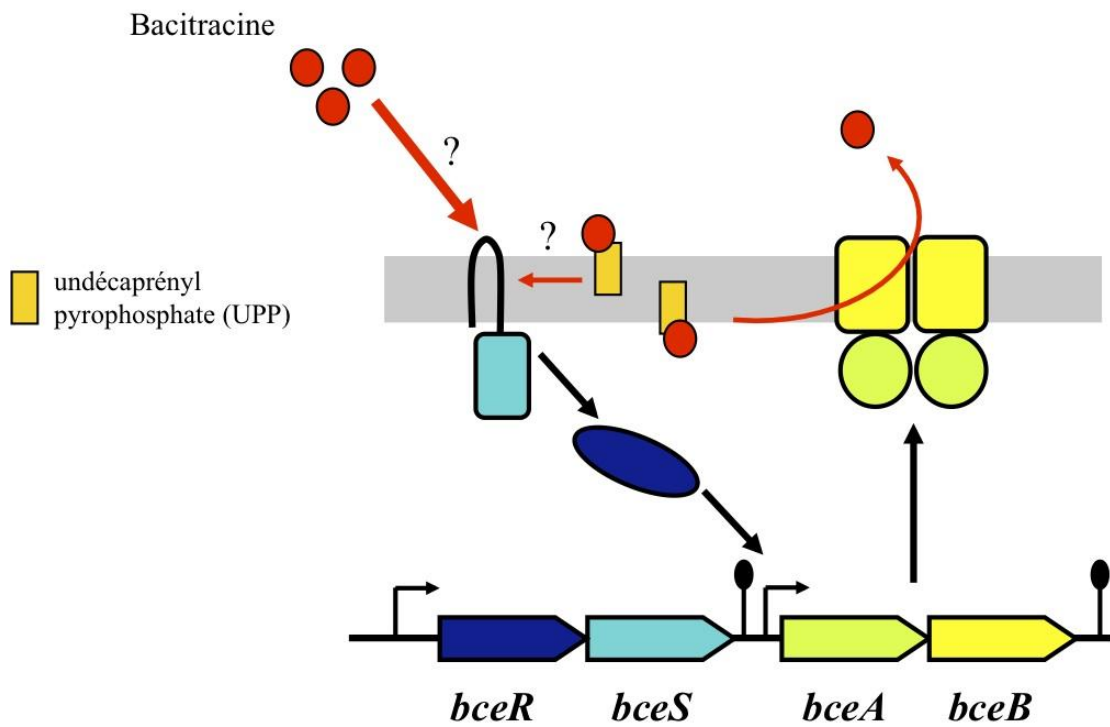


Fig.33 : Modèle d'étude du système BceRSAB.

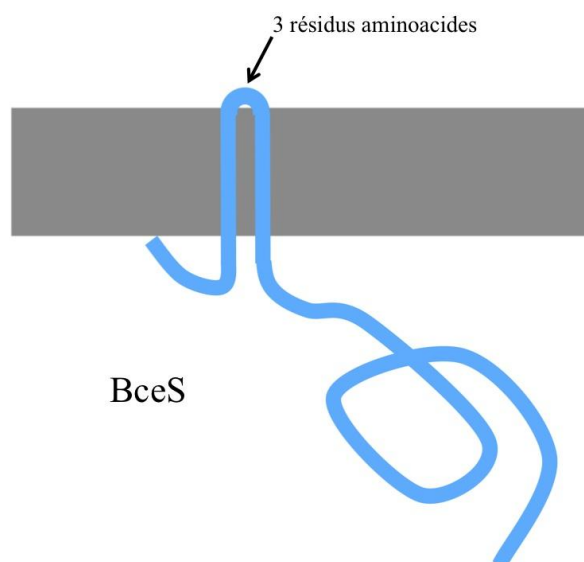


Fig.34 : Topologie du senseur BceS.

Cette histidine kinase possède deux fragments transmembranaires séparés par une boucle extracytoplasmique très courte de seulement trois résidus aminoacides et appartient à la famille des Intra Membrane-Histidine Kinase (IH-MK).

b) Fonctionnement et caractéristiques

Le système BceRSAB, permettant la résistance à la bacitracine, est donc un exemple de couplage fonctionnel entre un système phosphorelais du groupe IIIA (BceRS) et un transporteur ABC de la famille 9 (BceAB).

De façon classique, le senseur BceS percevrait directement la bacitracine, ce qui entrainerait son autophosphorylation puis la transphosphorylation du régulateur de réponse BceR. Ce dernier, ainsi fonctionnel, activerait l'expression des gènes *bceAB* du transporteur ABC (BceA : NBD, BceB : MSD). Le transporteur exprimé et localisé à la membrane pourrait, en tant que pompe d'efflux, prendre en charge la bacitracine et la rejeter dans le milieu extérieur (Fig.33).

Cependant, le fonctionnement de ce système est loin d'être aussi simple. En effet, le senseur BceS possède une topologie atypique avec deux fragments transmembranaires séparés par une boucle extracytoplasmique très courte de seulement trois résidus aminoacides et appartient donc à la famille des Intra Membrane-Histidine Kinase (IH-MK), dont nous avons parlé précédemment (Fig.34)(Mascher, 2006; Mascher et al., 2006). Ce senseur pourrait percevoir des stimuli membranaires. Il a d'ailleurs été montré au laboratoire que la modulation du pool d'UPP cellulaire influence l'induction des gènes du système par la bacitracine(Bernard et al., 2007). Cela suggère que l'UPP participe au stimulus du système. Cependant, la seule présence de ce composé ne suffit pas à activer le phosphorelais. L'hypothèse proposée pour le senseur BceS est qu'il pourrait détecter le complexe UPP/bacitracine plutôt que la bacitracine extracellulaire seule. De plus, le groupe de Mascher(Mascher et al., 2003) propose que le senseur BceS détecte ce stimulus puis le présente au transporteur ABC afin qu'il confère la résistance en prenant en charge ce complexe UPP/bacitracine (Fig.33, en orange et rouge).

D'autre part, il a été observé au laboratoire que l'induction des gènes *bceAB* par la bacitracine n'est plus possible dans une souche où les gènes *bceAB* sont interrompus(Bernard et al., 2007). Ainsi, la présence du système phosphorelais intact (BceRS) et de l'inducteur physiologique (la bacitracine) ne suffit pas à activer la transcription des gènes cibles *bceA* et *bceB*. Le transporteur ABC BceAB doit donc être présent et fonctionnel afin de permettre l'induction par la bacitracine du promoteur *PbceAB* contrôlant ses propres gènes de structure *bceA* et *bceB*.

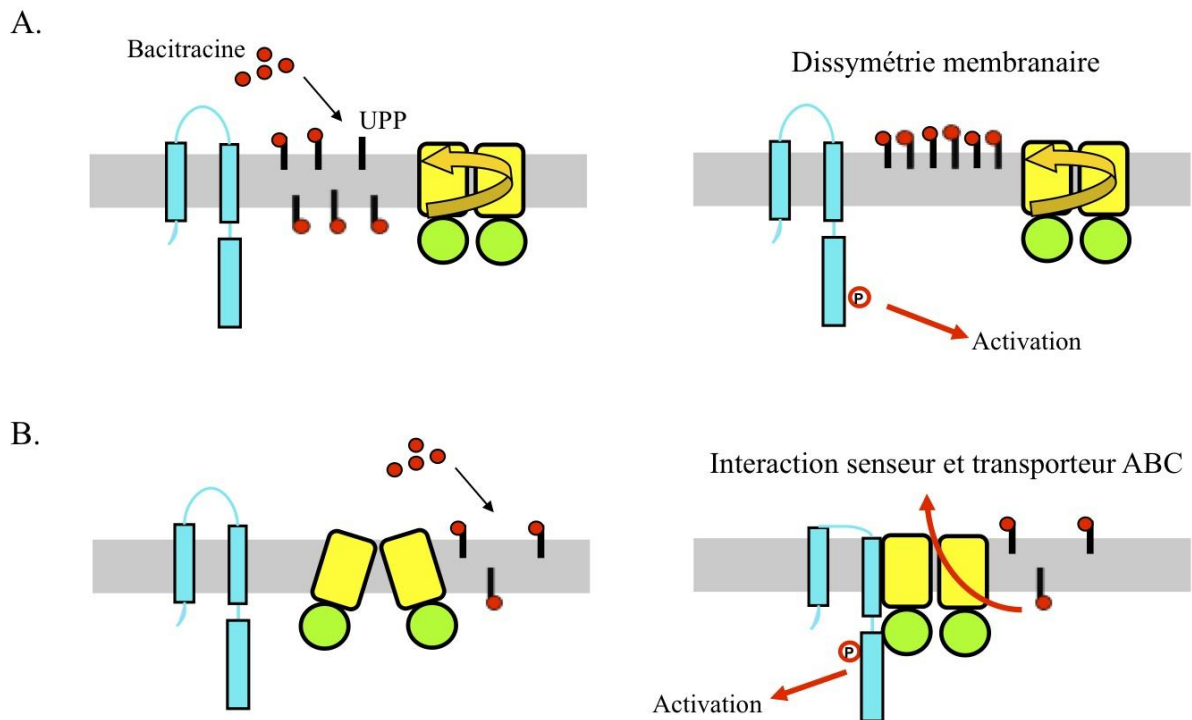


Fig.35 : Modèle d'activation du système BceRSAB.

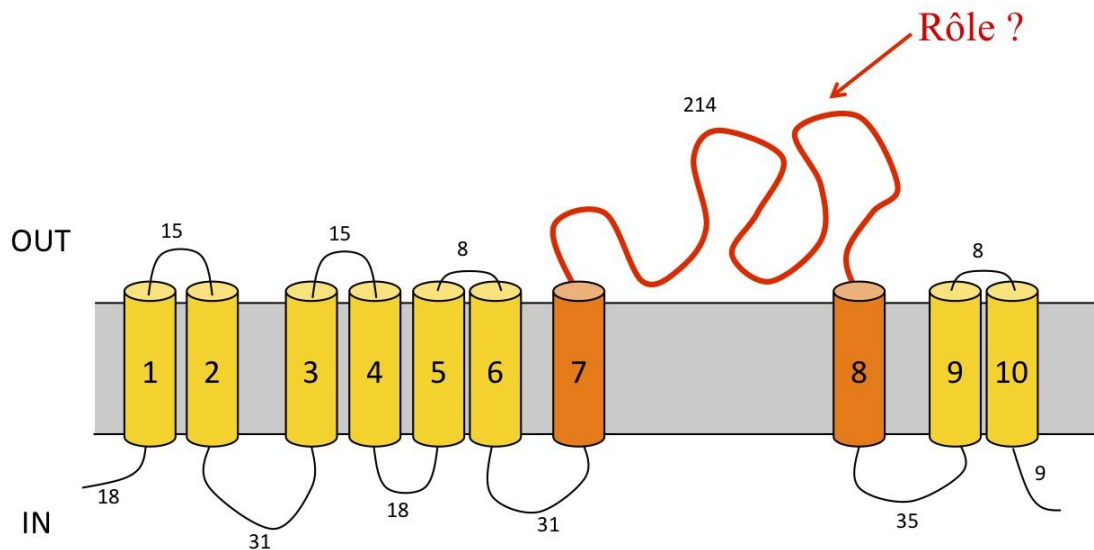


Fig.36 : Topologie de la MSD BceB.

BceB possède dix fragments transmembranaires, ainsi qu'une boucle extracytoplasmique, de plus de 200 résidus d'acides aminés, qui sépare les fragments transmembranaires 7 et 8. La structure particulière de cette boucle laisse penser qu'elle pourrait jouer un rôle important au sein du système BceRSAB.

Différents modèles du fonctionnement de l'activation du système peuvent être proposés (Fig.35). Ces modèles supposent que le stimulus du système n'existe pas en absence du transporteur ABC et que le transporteur ABC agit comme un exporteur. Il a été, en effet, prédit, au laboratoire, que le transporteur BceAB est un exporteur. Cette prédiction se base essentiellement sur l'absence de protéine affine type SBP (Substrate Binding Protein) toujours associée aux importeurs, et est contradictoire avec l'hypothèse formulée par l'équipe de Mascher (Rietkötter et al., 2008). Le premier modèle stipule que le transporteur ABC agirait comme une flippase en exportant le complexe UPP/bacitracine dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Cela créerait une dissymétrie membranaire qui serait alors ressentie par le senseur BceS. Le second modèle se base sur une interaction directe du domaine MSD du transporteur, BceB, et du senseur, BceS, en présence du stimulus qui engendrerait l'activation du phosphorelais. En absence de la bacitracine, le transporteur ABC en conformation « ouverte » ne pourrait pas interagir avec le senseur. La présence de son allocrite, par exemple le complexe UPP/bacitracine, entrainerait un changement conformationnel important du transporteur ABC qui passerait en conformation « fermée » et pourrait interagir avec le senseur pour activer le phosphorelais.

Par ailleurs, le translocateur BceB (MSD) possède dix fragments transmembranaires et présente une topologie particulière puisque une boucle extracytoplasmique de plus de 200 résidus d'acides aminés sépare les fragments transmembranaires 7 et 8 (Fig.36) (Rietkötter et al., 2008). Comme mentionné ci-dessus, notre hypothèse au laboratoire était que le transporteur BceAB ait le rôle d'un exporteur. Cependant, la structure singulière de cette boucle laisse penser qu'elle pourrait être impliquée dans la reconnaissance d'un allocrite extracellulaire afin de l'importer. En effet, le groupe de Mascher a suggéré l'importance de cette boucle dans la résistance de *B. subtilis* à la bacitracine (Rietkötter et al., 2008). Dans le cas du système BceRSAB, on pourrait alors imaginer un mécanisme alternatif de perception du stimulus, dans lequel la boucle de la perméase BceB reconnaîtrait la bacitracine ou le complexe UPP/bacitracine. Le transporteur ABC, ainsi activé, pourrait importer la bacitracine dans le cytoplasme de la bactérie, afin de la détourner de sa cible membranaire.

Enfin, il est à noter que les deux autres systèmes de *B. subtilis*, PdsRSAB et YxdJKLM, présentant une proximité génétique entre les gènes codant pour le phosphorelais et ceux codant pour le transporteur ABC, possèdent les mêmes caractéristiques structurales que le système BceRSAB. En effet, les senseurs PdsS et YxdK possèdent deux fragments

transmembranaires séparés par une boucle extracytoplasmique d'une taille inférieure à 15 résidus aminoacides et appartiennent également à la famille des IM-HK. De plus, chaque domaine MSD (PsdB et YxdM) possède, comme BceS, 10 fragments transmembranaires et présente une boucle extracytoplasmique, de plus de 200 résidus d'acides aminés, qui sépare les fragments transmembranaires 7 et 8. Cependant, si la topologie est identique, les séquences primaires de ces domaines MSD et, en particulier, celles des boucles extracytoplasmiques, ne sont que très peu conservées. Par ailleurs, il a été montré au laboratoire que le transporteur ABC PsdAB est nécessaire à la régulation du système en présence d'enduracidine.

Chez *B. subtilis*, il existe donc au moins deux systèmes additifs de résistance spécifiques à la bacitracine. Ces systèmes sont indépendants et la régulation de l'expression de leurs gènes de structure est également indépendante faisant intervenir soit un phosphorelais soit un facteur sigma alternatif. Leur participation dans la résistance n'est pas équivalente : le système BceRSAB est sans aucun doute le plus efficace.

Résultats

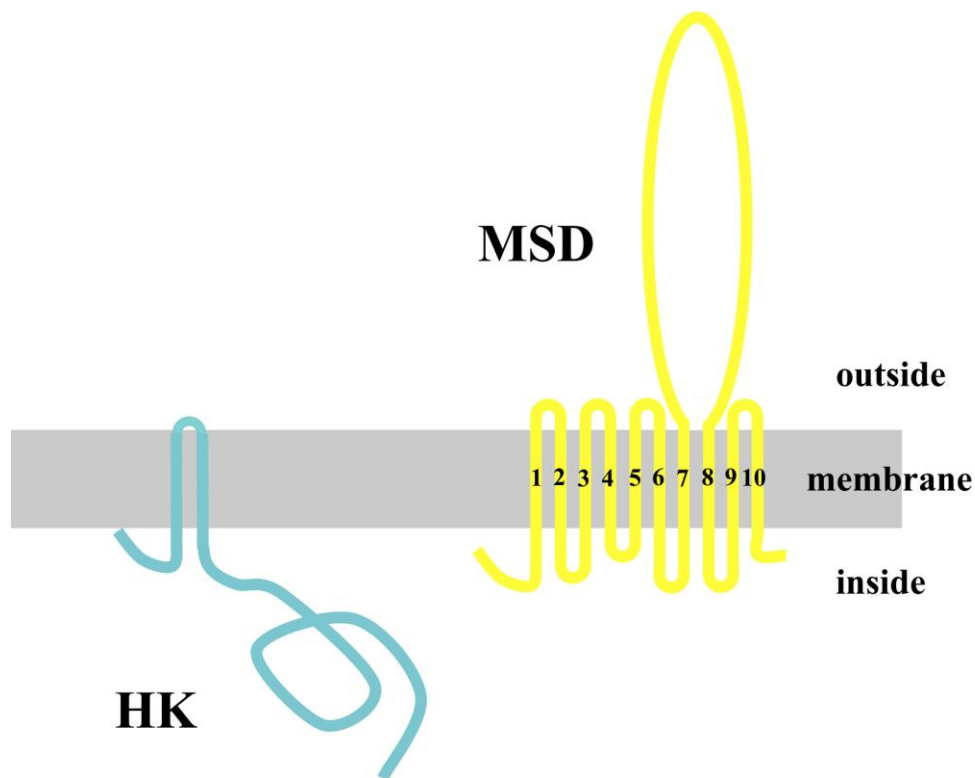


Fig.37 : Caractéristique structurales des senseurs et MSD, utilisés lors du recensement des systèmes phosphorelais/transporteur ABC.

Les histidines kinases de type IM-HK possèdent deux fragments transmembranaires encadrant une très courte boucle extra-cytoplasmique (≤ 12 résidus) et les MSD possèdent toutes 10 fragments transmembranaires, les fragments 7 et 8 étant séparés par une très large boucle extra-cytoplasmique de plus de 170 résidus.

I) A New Highly Conserved Antibiotic Sensing/Resistance Pathway in Firmicutes Involves an ABC Transporter Interplaying with a Signal Transduction System

A) Contexte de l'article

L'existence, chez *B. subtilis*, d'un lien entre un système de transmission du signal ou phosphorelais et un transporteur ABC, constituant des entités très similaires tant au niveau de la séquence de chacun des constituants que de l'organisation de leur gène sur le génome telles BceRSAB, PsdRSAB ou YxdJKLM, avait conduit notre laboratoire à réaliser une analyse phylogénomique de deux des quatre partenaires {Joseph 2002}. Il avait ainsi pu être montré qu'ils n'étaient présents que chez les Firmicutes et que phosphorelais et transporteurs ABC avaient co-évolué suggérant ainsi leur implication dans un même processus physiologique. Depuis cette étude, relativement restreinte compte-tenu du peu de génomes séquencés à l'époque (environ 50), il a été remarqué que les partenaires des couples phosphorelais/transporteur ABC possédaient des caractéristiques très particulières. C'est ainsi que les histidines kinases des systèmes de transmission du signal présentent toutes la même topologie membranaire, à savoir une boucle extracytoplasmique courte (moins de vingt-cinq résidus) encadrée de deux segments transmembranaires (Fig.37). Une étude exhaustive des histidines kinases et du type de signal qu'elles perçoivent, a permis au groupe de Mascher (Mascher, 2006) de classer celles appartenant aux couples phosphorelais/transporteur ABC dans la famille des histidines kinases percevant un signal intra-membranaire ou IM-HK (Intra Membrane-Histidine Kinase). D'autre part, les perméases ou MSD des transporteurs ABC possèdent toutes dix segments transmembranaires, les segments 7 et 8 étant séparés par une très large boucle extracytoplasmique (environ 200 acides aminés) (Fig.37). Ces nouvelles données, ainsi que la connaissance de la séquence d'un nombre de génomes bactériens beaucoup plus important (environ 800), nous ont incité à réaliser une nouvelle analyse phylogénomique, non pas simplement sur les deux partenaires les plus conservés (régulateur de réponse et domaine NBD de l'ABC transporteur) mais sur les quatre partenaires, en intégrant à l'analyse l'ensemble des connaissances dont nous disposions sur l'histidine kinase et la perméase du transporteur.

Au sein de notre groupe il a été montré que, chez *B. subtilis*, la réponse à la bacitracine conduisant à l'activation du promoteur *PbceA* par BceR, nécessitait la présence de l'ABC

transporteur(Bernard et al., 2007). Ce résultat nous avait amené à postuler l'existence d'une interaction entre le senseur BceS et l'une des deux sous unités de l'ABC transporteur en présence de bacitracine. Entre ces deux sous unités, BceB était le meilleur candidat puisque membranaire. Il nous a ainsi paru intéressant de réaliser, chez *B. subtilis*, un échange du transporteur BceAB par les transporteurs les plus proches phylogénétiquement ou par des transporteurs conférant la résistance à la bacitracine chez la bactérie dont ils étaient issus, en les plaçant sous le contrôle du promoteur *PbceA*. Cette approche présentait l'avantage de tester le transporteur ainsi réintroduit pour ses capacités à interagir avec BceS en réponse à la bacitracine puisque dans le cas d'une interaction, on s'attend à perdre la réponse à la bacitracine avec l'accroissement de la distance phylogénétique séparant BceB de la perméase de remplacement. Cette stratégie permettait également de tester si la production du transporteur hétérologue, en présence du régulateur BceR surexprimé, confèrait à *B. subtilis* la résistance à la bacitracine.

Finalement, nous avons cherché à appréhender le rôle fonctionnel de la boucle extracytoplasmique de la MSD. En effet, les résultats obtenus par le groupe de T. Mascher(Rietkötter et al., 2008) suggéraient un rôle essentiel puisque la délétion de cette boucle entraînait une perte de l'activité de BceAB dans la réponse à la bacitracine. Nous avons donc mis en place un outil génétique nous permettant d'échanger la boucle de BceB de *B. subtilis* avec la boucle d'un transporteur ABC de la même famille et ainsi, de construire des modules chimériques comprenant le phosphorelais de *B. subtilis* et le transporteur ABC de *B. subtilis* avec un translocateur dont la boucle a été changée. Les souches correspondantes ont été étudiées pour leur réponse et leur résistance à la bacitracine.

Les différentes approches citées ci-dessus font l'objet de l'article qui suit.

B) Article

A New Highly Conserved Antibiotic Sensing/Resistance Pathway in Firmicutes Involves an ABC Transporter Interplaying with a Signal Transduction System

Stéphanie Coumes-Florens^{1,2}, Céline Brochier-Armanet^{1,3}, Annick Guiseppi^{1,2}, François Denizot^{1,2*}, Maryline Foglino^{1,2}

1 Laboratoire de Chimie Bactérienne (UPR9043), Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IFR88), CNRS, Marseille, France, **2** Université de la Méditerranée, Marseille, France, **3** Université de Provence, Marseille, France

Abstract

Signal transduction systems and ABC transporters often contribute jointly to adaptive bacterial responses to environmental changes. In *Bacillus subtilis*, three such pairs are involved in responses to antibiotics: BceRSAB, YvcPQRS and YxdJKLM. They are characterized by a histidine kinase belonging to the intramembrane sensing kinase family and by a translocator possessing an unusually large extracytoplasmic loop. It was established here using a phylogenomic approach that systems of this kind are specific but widespread in Firmicutes, where they originated. The present phylogenetic analyses brought to light a highly dynamic evolutionary history involving numerous horizontal gene transfers, duplications and lost events, leading to a great variety of Bce-like repertoires in members of this bacterial phylum. Based on these phylogenetic analyses, it was proposed to subdivide the Bce-like modules into six well-defined subfamilies. Functional studies were performed on members of subfamily IV comprising BceRSAB from *B. subtilis*, the expression of which was found to require the signal transduction system as well as the ABC transporter itself. The present results suggest, for the members of this subfamily, the occurrence of interactions between one component of each partner, the kinase and the corresponding translocator. At functional and/or structural levels, bacitracin dependent expression of *bceAB* and bacitracin resistance processes require the presence of the BceB translocator loop. Some other members of subfamily IV were also found to participate in bacitracin resistance processes. Taken together our study suggests that this regulatory mechanism might constitute an important common antibiotic resistance mechanism in Firmicutes. [Supplemental material is available online at <http://www.genome.org>.]

Citation: Coumes-Florens S, Brochier-Armanet C, Guiseppi A, Denizot F, Foglino M (2011) A New Highly Conserved Antibiotic Sensing/Resistance Pathway in Firmicutes Involves an ABC Transporter Interplaying with a Signal Transduction System. PLoS ONE 6(1): e15951. doi:10.1371/journal.pone.0015951

Editor: Paul Cobine, Auburn University, United States of America

Received: August 18, 2010; **Accepted:** December 1, 2010; **Published:** January 19, 2011

Copyright: © 2011 Coumes-Florens et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: S. Coumes-Florens was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (France). C. Brochier-Armanet is supported by an "Action Thématique et Incitative sur Programme (ATIP)" from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). This work was supported by the Université de la Méditerranée and the CNRS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: denizot@ifr88.cnrs-mrs.fr

Introduction

Survival of microorganisms in their natural habitat depends on their ability to cope with fast environmental changes by controlling parameters such as ionic strength and osmotic pressure, making use of the nutrients available and resisting any toxic compounds present in the environment. Microorganisms have developed sophisticated signal transduction systems whereby extracellular stimuli are detected by membrane-integrated sensors [1]. The signals generated by these sensors are then usually transmitted across the cytoplasmic membrane via a phosphorylation cascade [2]. In the simplest systems of this kind, which are known as two-component systems, a two-step phosphorus transfer process is effected by a histidine protein kinase (HK) and a response regulator protein (RR). Kinases were recently classified in three major groups based on their structural properties [1]. The first and largest group consists of extracellular sensing kinases with a large extracytoplasmic detection domain. The second group is composed of kinases in which 2 to 20 transmembrane segments are

connected by very short linkers. These kinases are able to detect membrane or membrane-associated stimuli and have therefore been called intra-membrane sensing kinases. The third group contains kinases with a cytoplasmic sensor domain. Once a stimulus has been sensed, the kinase autophosphorylates a conserved histidine residue present in its transmitter domain. The phosphoryl group is subsequently transferred to a conserved aspartate residue in the regulator receiver domain, which controls the expression of target genes [3]. There exist other, more complex regulatory systems involving the activation of a four-step phosphorylation cascade via extra receiver and transmitter domains [4].

Transport proteins also play an important role in microorganisms' adaptation to their environment by carrying the substrates detected across the cell cytoplasmic membrane. The role of these proteins is not restricted to transport and in some cases, they may also transmit information. There exist increasing evidences that signal transduction systems can be associated with transporters acting as co-sensors [5,6]. Among the transporters, those of the

ABC type are widespread, since they are present in all living organisms and they constitute one of the largest protein families [7]. These transporters are membrane proteins that hydrolyse ATP and thus energize the translocation of various solutes (such as ions, sugars, amino acids, vitamins, peptides, polysaccharides, hormones, lipids and xenobiotics, etc.) across the cell membrane [7,8,9]. ABC transporters are usually composed of two nucleotide binding domains (NBDs), which bind and hydrolyse ATP, and two membrane spanning domains (MSDs), which have also been called permease or translocators, containing multiple transmembrane segments [10]. In bacteria, ABC transporters are usually encoded by genes that are part of the same or neighbouring operons [11].

The *Bacillus subtilis* BceRSAB proteins involved in bacitracin resistance constitute one of the most fully studied systems in which an ABC transporter (BceAB) is combined with a signal transduction (BceRS) system [6]. It has been established in recent experimental studies that bacitracin response of course requires the BceRS signal transmission system but also a functional BceAB ABC transporter [12] and therefore involves an original and complex regulatory process. The *B. subtilis* BceAB belongs to ABC transporter family 9, all the members of which are thought to be involved in antibiotic resistance [13]. The genome of *B. subtilis* encodes two additional systems homologous to BceRSAB, namely YvcRSPQ and YxdLMJK, the expression of which is induced by enduracidin and cathelicidin LL-37, respectively. Interestingly, these three systems show several common features. First, each system is encoded by neighbouring genes on the chromosome. Secondly, the BceS, YvcQ and YxdK kinases are composed of two nearly contiguous transmembrane segments (TMS) separated by a short extra-cytoplasmic linker (consisting of less than 11 amino-acids, Figure 1). These kinases therefore belong to the intramembrane sensing histidine kinase family [1]. Lastly, the BceB, YvcS and YxdM MSD components harbour exactly 10 TMS with an unusually large extracytoplasmic loop (from 197 to 213 residues) located between helix number 7 and helix number 8 (Figure 1). It was recently suggested that this loop might play a crucial role in the response of *B. subtilis* BceRSAB to bacitracin [14]. The functional association between an ABC transporter and a two-component system showing the different features described above will be referred to from now on as the Bce-like module.

In this study, phylogenetic analysis was performed on the four components of the Bce-like modules [13] present in the complete genomes available. These modules are widespread in Firmicutes (i.e. low G+C Gram-positive bacteria) and apart from one exception, they are restricted to this bacterial phylum, where they probably originated. The presence of multiple Bce-like copies observed in many Firmicutes suggests that these modules might contribute importantly to antibiotic resistance in this bacterial phylum. We also established that horizontal gene transfer and duplication/loss events have played an important role in the evolutionary history of Bce-like modules, leading to the acquisition of new antibiotic resistance mechanisms. Based on the present analyses, a phylogenetic classification of Bce-like modules is proposed, which could serve as a reference for functional analyses.

To further investigate the role of the ABC transporter and of the large extracytoplasmic MSD loop in the signal transduction process, Bce-like module translocators belonging to the same subfamily as the *B. subtilis* BceB were investigated. Using *B. subtilis* as a recipient, several members of this group were found to be involved in bacitracin resistance mechanisms. It was also observed that the presence of the large BceB loop is essential not only to the bacitracin dependent expression of *bceAB* but also to the resistance of the bacteria to this antibiotic.

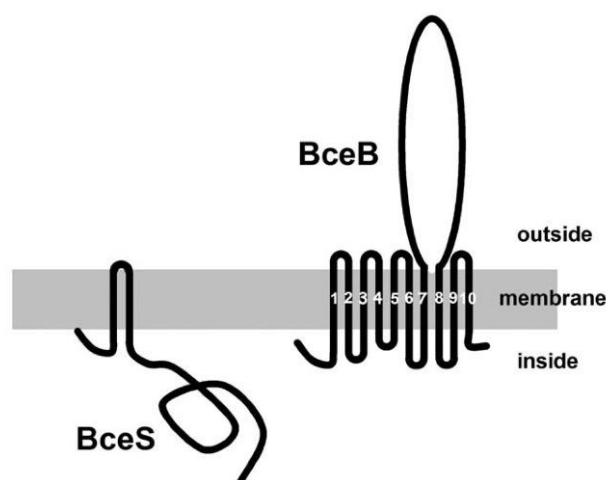


Figure 1. Predicted membrane topologies of histidine kinase and ABC transporter translocators in *Bacillus subtilis* Bce-like modules. The three pairs of *B. subtilis* signal transduction system/ABC transporters: Bce, Yxd and Yvc systems. Transmembrane segments (TM) are numbered from 1 to 10 in the translocator. The extracytoplasmic loop between the two TMs of the kinase varied in length from 3 to 11 residues, whereas TM7 and TM8 of the translocators are separated by 197 to 213 residues.

doi:10.1371/journal.pone.0015951.g001

Results

Taxonomic distribution and genetic organisation of the four components of the Bce-like modules

A search was performed for homologues of each of the four Bce-like module components in the 778 completely sequenced genomes available at the NCBI in February 2009 and a phylogenetic analysis was then conducted using maximum likelihood methods. This search yielded 999, 579, 1000 and 314 homologues of BceR (RR), BceS (HK), BceA (NBD) and BceB (MSD), respectively. The BceR and the BceS homologues were mainly found to exist in Bacteria, whereas BceA homologues were also present in Archaea, whereas the taxonomic distribution of BceB homologues was restricted to Firmicutes and to one Spirochaete (i.e. *Treponema denticola* ATCC 35405) (Table S1).

Among the 579 BceS homologues collected, 212 showed the same architectural features as *B. subtilis* BceS, i.e. exactly two TMS separated by a loop consisting of 12 amino acids or less. This number did not increase significantly when the threshold loop length was set at 14, since 214 homologues were detected in this case. The 212 HK showing the same architectural features as BceS will be referred to hereafter as BceS-like. Interestingly, with only a few exceptions, BceS-like sequences formed a monophyletic group in the maximum likelihood BceS tree (Figure S1). Apart from this cluster, however, most of the BceS homologues showed different features (i.e. either more or less than two TMS segments and/or longer loops, Figure S1). This suggests that all the BceS homologues in which there are two TMS connected by a short linker have a single evolutionary origin. The non canonical architectural features observed in a few BceS-like sequences such as those found to occur in *Lysinibacillus sphaericus* (YP_00169681) and *Bacillus halodurans* (NP_241142) represented therefore secondary modifications, whereas the presence of a few BceS-like sequences outside this group probably resulted from sporadic convergences (Figure S1). Similar findings and conclusions can be reached on the 293 MSD sequences which, like *B. subtilis* BceB,

were found to harbour exactly ten TMS and to have a long extracytoplasmic loop (i.e. more than 170 amino acids) located between TMS numbers 7 and 8 (Figure S2). Interestingly, BceS-like and BceB-like families showed similar taxonomic patterns of distribution: apart from one exception, they were both restricted to and specific to Firmicutes (Figures S1 and S2).

The phylogenies of the two remaining components (RR and NBD) harboured a monophyletic cluster, which was quite similar in terms of the taxonomic distribution to those obtained with BceS-like and BceB-like homologues (data not shown). The sequences recorded in these clusters will be referred hereafter as BceR-like and BceA-like.

The fact that the taxonomic distribution of the Bce-like component is restricted to Firmicutes strongly suggests that they originated in this phylum. To pursue this point further, a Bayesian phylogenetic analysis was performed on each Bce-like component. Although the four resulting trees were not completely resolved, they showed very similar topologies (Figures 2–3 and Figures S3–S4). This indicates that the four components underwent the same evolutionary history after their emergence in Firmicutes.

This hypothesis was supported by our survey of the genomic sequences, which showed that apart a few exceptions, the genes encoding a *bce*-like component formed a cluster containing at least one copy of each component (Table S1). The fact that their physical proximity in the genomes was highly conserved might account for the co-evolution of the genes encoding Bce components, which was highlighted by the results of the present phylogenetic analyses. These findings also suggest that ancestors of these genes already formed a single cluster corresponding to a functional module.

Interestingly, although most clusters contain only one gene copy of each *bce*-like element, some of them contain several genes coding for MSD and/or NBD components (Table S1). Most of these additional copies (e.g. the three MSD sequences of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 (YP_001647460, YP_001647461 and YP_001647463) resulted from recent gene duplication events, Figure 2). This suggests either that some signal transduction systems might control the expression of several ABC transporter coding genes or that ABC transporter might be formed by heteroduplex rather than simple homodimer (NBD-MSD)₂. Another atypical situation was previously encountered with *bceA*- and *bceB*-like genes such as *SalX* (NP_269896) and *SalY* (NP_269895) from *Streptococcus pyogenes* which have been found to be involved in salivarin resistance [15]. These genes are clustered together with genes encoding for RR and HK that are not homologous to *B. subtilis* BceS and BceR. This indicates that a secondary association of genes coding for ABC transporters was formed with regulatory/transduction coding genes from other systems.

Toward a classification of Bce-like modules

Based on the phylogenetic analysis of the components of Bce-like modules, these modules were subdivided into six subfamilies. Subfamily I was observed in trees based on MSD, RR and NBD (branches in green, Posterior Probability (PP) = 1.00, 1.00 and 0.74 respectively, Figures 2–3 and Figure S4) and mainly included sequences from Clostridiales. In the kinase based tree, this subfamily consisted of two parts (Figure S3), possibly due to a rather weak overall resolution of this phylogeny. Subfamily II was mainly found in Lactobacillales and Clostridiales, but also in some Spirochaetes sequences (branches in light pink, PP = 1.00 (MSD), 0.50 (RR), 1.00 (HK) and 1.00 (NBD), Figures 2–3 and Figures S3–S4). The emergence of *Treponema denticola* ATCC 35405 Bce-like sequences in subfamily II indicated that this spirochaete had

acquired the four genes from a single Firmicutes donor via a single horizontal gene transfer. This subfamily was also found to include the BceRSAB module (components NP_721401 to 721404) and the YP_001835606, YP_001835607 ABC transporter, which are known to participate in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans* [16,17] and *S. pneumoniae* [18,19], respectively. Subfamily III was mainly present in Clostridiales and Bacillales (branches in dark pink, PP = 0.81 (MSD), 1.00 (RR), 1.00 (HK), 0.81 (NBD), Figures 2–3 and Figures S3–S4). However, the corresponding group in the NBD tree also included a few sequences belonging to the fifth subfamily (see below) (Figure S4). This subfamily included sequences from the Yxd and Yvc modules of *B. subtilis* which are activated by LL-37 and enduracin, respectively. Subfamily IV contains the components of the *B. subtilis* Bce module, as well as sequences coding for the *VraFG* ABC transporter (YP_416104, YP_416105) coupled to the *GraRS* two-component system (YP_416102, YP_416103) from *Staphylococcus aureus*, which are involved in vancomycin resistance [20]. This subfamily was found to occur mainly in Bacillales (branches in orange, PP = 1.00 in the fourth trees, Figures 2–3 and Figures S3–S4). Subfamily V had a widespread pattern of occurrence in Firmicutes and included sequences from Clostridiales, Bacillales and Lactobacillales. This was the least strongly supported family, which was only detected and weakly supported in mainly the BceR tree (branches in blue, PP = 0.50, Figure 3), however in the other trees, the corresponding sequences often occurred close together, which suggests that they might be related. The BceA-like and BceB-like trees contained the *AnrAB* ABC transporter (NP_465638, NP_465639) which has been reported to be involved in *Listeria monocytogenes* bacitracin resistance [21]. They also included MSD and NBD components of the ABC transporter which are encoded in *Streptococcus pyogenes* genomes by *salX* and *salY* (NP_269895 and NP_269896, Figures 2 and S4. See also Table 1). Contrary to the other Bce-like modules on which functional data are available, the *S. pyogenes* transporter is not involved in antibiotic resistance, but in antibiotic biosynthesis. More specifically, the corresponding genes were found in a cluster involved in salivarin biosynthesis which, in addition to *salX* and *salY*, contained the *salA* salivarin structural gene, the *salB* and *salT* enzyme modification genes, and *salR* and *salK*, encoding a signal transduction system which is not homologous to BceRS. Lastly, subfamily VI was mainly found to occur in Bacillales and Lactobacillales. Unlike the other subfamilies, it contains only BceB- and BceA-like components (purple branches, PP = 1.00 in both trees, Figure 2 and Figure S3). This means that no BceR- or BceS-like sequences belong to this family.

The similarities in the topology of these four trees indicate that the components have undergone similar evolutionary histories and thus, that they have co-evolved. It is worth noting that in each subfamily, the phylogeny of the sequences did not follow the phylogeny of the corresponding species. For example, *Staphylococcus* sequences belonging to subfamily II were more closely related to Lactobacillales and Clostridiales sequences than to sequences of other Bacillales (Figures 2–3, and Figures S3–S6). In addition, the taxonomic distribution of these subfamilies showed that closely related species may harbour very different gene repertoires. For instance, *Geobacillus thermodenitrificans* contained only components from subfamily III, whereas its close relatives *Geobacillus kaustophilus* and *Anoxybacillus flavithermus* harboured only components from subfamily IV or no components at all, respectively (Figure S5b). The great disparity between organisms and gene phylogeny suggest that the genes coding for these components have been extensively transferred during the evolution of Firmicutes. It is also difficult to trace the evolutionary history of Bce-like modules because of gene duplication events such as those involving MSD

Figure 2. Phylogeny of the BceB-like proteins (MSD components). Bayesian tree showing the relationships in a subsample of 164 BceB-like sequences. The accession number of each sequence is provided. Numbers at nodes are posterior probabilities. The scale bar indicates the average number of substitutions per site. Based on the phylogeny of each component, six subfamilies (numbered from I to VI) were defined; they are indicated here by brackets and colours. Symbols represent Bce-like components encoded by genes located in the neighbourhood of *bceB*-like homologs: triangles correspond to MSD, crescents to regulators, circles to kinases, squares to NBD, and numbers indicate the number of non *bce*-like genes. The arrow indicates the direction of transcription. Color of the symbols indicates to which family they belong and corresponds to the color of the tree branches (green I; light pink II; dark pink III; orange IV; blue V, purple VI, whereas black is used to designate unclassified homologs and white symbols indicate non homologous regulators, kinases, NBDs or MSDs). BceB, YvcS and YxdM from *B. subtilis* homologs are indicated in red and by a thick arrow. The unique non Firmicutes BceB-like homologue from *T. denticola* is shown in light blue. The length of the alignment used to construct the tree was 251 residues. BceB-like proteins used for recombinant strain construction were indicated in bold characters.

doi:10.1371/journal.pone.0015951.g002

components from *Bacillus anthracis* belonging to subfamily III (Figure 2) and because of gene losses: our detailed survey of complete genomes brought to light a number of degenerated sequences, which were annotated as pseudogenes (some of them were tested experimentally) (Table S1). This suggests that although the acquisition of genes coding for components of the Bce-like system occurred relatively frequently as the result of horizontal gene transfer and/or gene duplication events, these genes were also frequently lost, which would explain the great variability observed among the *bce*-like genes. Accordingly, the evolutionary history of these genes must have been highly complex and it cannot be completely explained. In particular, it is impossible to say from which lineage of Firmicutes the ancestral Bce-like module emerged. However, the wide pattern of distribution shown by this module among Firmicutes suggests that these systems play an important functional role in this group of bacteria.

This clarification of the evolutionary relationships between Bce-like modules should provide a good starting point for functional studies as indicated below.

Determining the role of the ABC transporter: the case of subfamily IV

1) At the bacitracin resistance level. In subfamily IV, several transporters have been either found or thought to confer bacitracin resistance to the bacterium in which they are expressed. This was found to be the case with BceAB from *B. subtilis* [22–24] and might also be the case with its closest homologues, YtsCD (YP_081283 and YP_081282) from *B. licheniformis* because it has been established that *ytsCD* genes are up-regulated in the presence of bacitracin [25]. It has also been suggested that VraDE (YP_418021 and YP_418022) may participate in bacitracin resistance in *S. aureus* [26]. Contrasting with the specificity of subfamily IV members toward bacitracin, VraFG (YP_416104 and YP_416105) from *S. aureus* also respond to vancomycin [20]. BceAB (NP_244781 and NP_244782) from *B. halodurans*, the functional role of which has not yet been elucidated, are very closely related to *B. subtilis* BceAB. To further investigate how they contribute to bacitracin resistance, the corresponding genes were introduced into *B. subtilis* at the *bceAB* locus under the control of the *bceAB* promoter (*YtsCDBli*, *BceABShi*, *VraDESa_{ii}* and *VraFGSa_{ii}* strains, Table S2). 6 His codons were added at the 5' terminus of the transporter's NBD coding genes to facilitate the detection of the protein (see Material and Methods). Control assays were carried out using a strain in which the *B. subtilis bceAB* genes were reintroduced into *B. subtilis* using the same procedure (*BceABShi* strain). All strains were then tested to determine their bacitracin IC₅₀ levels (the bacitracin concentration giving a 50% growth inhibition). In comparison with the BSGY005 strain, which includes a wild type *bce* locus (IC₅₀ = 281 ± 61 μg.ml⁻¹, Table 1), the control *bceABShi* strain was found to be less resistant (IC₅₀ = 98 ± 22 μg.ml⁻¹, Table 1). This difference might be due to the addition of a His6-tag at the NH2 terminus of the BceA NBD protein. As all the strains contained an NBD gene expressing

a protein bearing this slight modification, their IC₅₀ were compared with that of the *bceABShi* strain IC₅₀. The *ytsCDBli* strain showed the same level of bacitracin resistance (IC₅₀ = 90 ± 22, Table 1) suggesting that the *B. licheniformis* YtsCD ABC transporter may have a similar function to that of the *B. subtilis* BceAB ABC transporter. A lower level of resistance was observed with the *bceABShi* strain (IC₅₀ = 13 ± 0.8, Table 1). Surprisingly, the *vraDESa_{ii}* strain and the *vraFGSa_{ii}* both showed no resistance to bacitracin: both strains had similar IC₅₀ values to that of the $\Delta bceAB$ strain (IC₅₀ ≤ 1.4 μg.ml⁻¹, Table 1). A decrease in ABC transporter expression might explain either the partial or complete absence of complementation observed with the various strains. To test the ABC transporter efficiency without any bacitracin induction, pDG*bceR* was introduced into the various strains and BceR was overproduced by IPTG induction. These conditions were found to mimic the bacitracin signal and the *bceS* deleted strain overproducing BceR was as resistant to bacitracin as the WT strain (unpublished data). Western blot analysis with a His-tag detection system showed that under IPTG induction conditions, each reconstituted ABC transporter was synthesized in a fairly similar level to that of the wild type strain and was expressed at membrane level (data not shown). No significant effects of IPTG on the IC₅₀ values were detected in any of the strains except for *bceABShi*, where a faint increase in the IC₅₀ was observed (IPTG fold induction = 2.3, Table 1), which indicates that this reconstituted ABC transporter is partially functional in *B. subtilis*. All in all, the results of these experiments suggest that a) bacitracin resistance decreases with the phylogenetic distance between BceAB and the substituted transporter (from *B. licheniformis* YtsCD to *S. aureus* VraDE), although the amounts of reconstituted ABC transporter at the cell membrane in the corresponding strains were fairly similar to those of the wild type strain; b) it was established here for the first time to our knowledge that *YtsCDBli* and *BceABShi* confer bacitracin resistance on the bacteria in which they are expressed.

2) At the bacitracin induction level. To test the ability of the reconstituted ABC transporter to participate in *PbceAB* promoter activation in the presence of bacitracin, a *PbceAB::lacZ* transcriptional fusion was introduced at the available *amyE* locus in all the strains (WT, $\Delta bceAB$, *bceABShi*, *ytsCDBli*, *bceABShi*, *vraDESa_{ii}* and *vraFGSa_{ii}*). The activity of this fusion was monitored when the strains were grown in either the presence or absence of bacitracin.

Without bacitracin, almost no β -galactosidase activity ($\leq 0.6 \pm 0.4$ unit) was detected in any of the strains (Table 2). When bacitracin (4 μg.ml⁻¹) was added to the cell culture, no β -galactosidase activity (≤ 0.2 unit) was observed in *vraDESa_{ii}* or *vraFGSa_{ii}* strains, whereas *bceABShi* and *ytsCDBli* strains were perfectly able to respond even more strongly to bacitracin than in the case of the BSGY005 strain (61 ± 15 units, 38 ± 6 units and 39 ± 11 units, respectively). Lastly, a very faint β -galactosidase activity was observed when the *bceABShi* strain was grown in the presence of bacitracin (2 ± 1 units, Table 2).

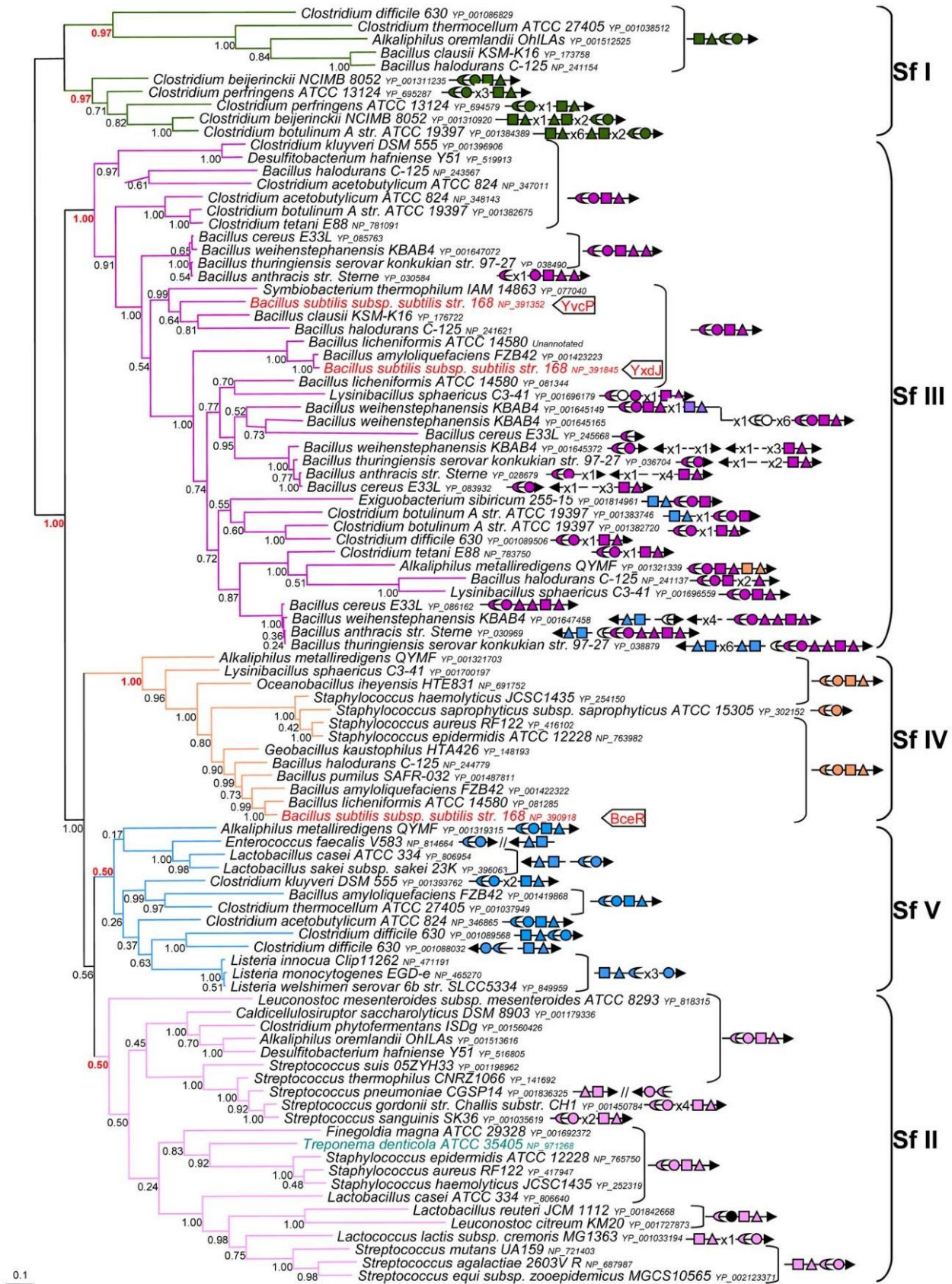


Figure 3. Phylogeny of the BceR-like proteins (regulators). Bayesian tree showing the relationships in a subsample of 96 BceR sequences. The accession number of each sequence is provided. Numbers at nodes are posterior probabilities. The scale bar indicates the average number of substitutions per site. For details about colours and symbols, see the legend to Figure 2. The length of the alignment used to construct the tree was 187 residues.
doi:10.1371/journal.pone.0015951.g003

These results show that a) the presence of the His tag at BceA NH2 terminus did not hamper the ability of the reconstituted ABC transporter to produce a sustained response to bacitracin b) the response decreased rapidly as the phylogenetic distance between the replacing transporter and *B. subtilis* BceAB increased, and only *B. licheniformis* YtsCD, the most closely related ABC transporter, was able to even partially compensate for this decrease.

The presence of the large extra-cytoplasmic BceB loop is essential to bceAB promoter induction and bacitracin resistance

To determine the functional role of the BceB loop, a *B. subtilis* *bceB*Δloop strain and a *B. subtilis* strain in which the encoding BceB loop region was reintroduced into *bceB* using the procedure described in Material and Methods (*bceB*loopBceBBs_{ri} strain) were compared in terms of their ability to activate the *bceA* promoter in the presence of bacitracin: the two strains tested here carried a *PbceAB::lacZ* transcriptional fusion at the *amyE* locus. As was to be expected, no significant β-galactosidase activity above the background levels (0.7 ± 0.2 unit) was detected in any of these strains when bacitracin was omitted (Table 2). In the presence of bacitracin ($4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), almost no activity was recorded in the *bceB*Δloop (0.6 ± 0.3 unit, Table 2), whereas a greater level of response than that recorded with the BSGY005 strain (containing a wild type *bce* locus) occurred in the *bceB*loopBceBBs_{ri} strain (75 ± 15 units, Table 2). This shows that the BceAB ABC transporter was completely restored by reintroducing the BceB loop. These results show that normal bacitracin induced *bceAB* expression requires the presence of the BceB loop.

The bacitracin IC₅₀ value was then determined in the two strains mentioned above. The IC₅₀ value of the *bceB*Δloop strain was similar to that of the *ΔbceAB* strain ($1.9 \pm 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Table 1). This value was more than two orders of magnitude lower than the IC₅₀ of the BSGY005 strain (around $280 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). This result is in good agreement with the inability of the *bceB*Δloop strain to activate the *PbceAB* promoter in the presence of bacitracin (Table 2) and thus to synthesize the BceAB*bceB*Δloop transporter. All these strains were then tested under *bceR* over-expression conditions and the *bceB*Δloop pDG*bceR* strain was found to be as sensitive to bacitracin (IC₅₀ = $3.2 \pm 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) as the *ΔbceAB* pDG*bceR* strain (Table 1). However, the *bceB*loopBceBBs_{ri} pDG*bceR* strain and the *bceABBs_{ri}* pDG*bceR* strain used as a control showed practically the same significant increase in bacitracin resistance (IC₅₀ values around $140 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Table 1), which indicates that bacitracin resistance in *B. subtilis* requires the presence of the BceB loop.

The Δloop BceAB ABC transporter is expressed at membrane level

The lack of bacitracin resistance observed in the *bceB*Δloop, pDG*bceR* strain grown in medium containing IPTG might be attributable to a defective BceAB ABC transporter insertion into the bacterial membrane. Western blots obtained using an anti-BceA polyclonal antibody clearly showed the presence of the BceA protein in the IPTG induced *bceB*Δloop pDG*bceR* strain, both in the crude extract (Figure 4, lane 1) and in the cell lysate obtained after eliminating the cell debris (Figure 4, lane 2). Upon subjecting the cell lysate to sub-cellular fractionation and testing the sub-

Table 1. Bacitracin resistance of various *B. subtilis* strains.

– IPTG		+ IPTG		Ratio +/-
Strains	mean ± SD	Strains	mean ± SD	
BSGY005	281 ± 61	pDG <i>bceR</i>	316 ± 28	1.1
Δ <i>bceAB</i>	1 ± 0.4	Δ <i>bceAB</i> , pDG <i>bceR</i>	1.3 ± 0.3	nc
<i>BceABBs_{ri}</i> (<i>B. subtilis</i> NP_390916/NP_390915)	98 ± 22	<i>bceABBs_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	142 ± 19	1.4
<i>YtsCDBI_{ri}</i> (<i>B. licheniformis</i> YP_081283/YP_081282)	90 ± 22	<i>ytsCDBI_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	133 ± 7	1.5
<i>BceABBh_{ri}</i> (<i>B. halodurans</i> NP_244781/NP_244782)	13 ± 0.8	<i>bceABBh_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	30 ± 4	2.3
<i>VraDESa_{ri}</i> (<i>S. aureus</i> RF122 YP_418021/YP_418022)	1.4 ± 0.3	<i>vraDESa_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	2 ± 1.1	nc
<i>VraFGSa_{ri}</i> (<i>S. aureus</i> RF122 YP_416104/YP_416105)	1.2 ± 0.5	<i>vraFGSa_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	1.1 ± 0.1	nc
<i>bceBBsΔloop</i> (<i>B. subtilis</i> NP_390915 Δloop)	1.9 ± 0.1	<i>bceBBsΔloop</i> , pDG <i>bceR</i>	3.2 ± 1.5	nc
<i>ytsDBIΔloop</i> (<i>B. licheniformis</i> YP_081282 Δloop)	1 ± 1	<i>ytsDBIΔloop</i> , pDG <i>bceR</i>	1.5 ± 0.9	nc
<i>BceBloopBceBBs_{ri}</i> (<i>B. subtilis</i> NP_390915 with <i>B. subtilis</i> NP_390915 loop)	110 ± 11	<i>bceBloopBceBBs_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	140 ± 23	1.3
<i>BceBloopYtsDBI_{ri}</i> (<i>B. subtilis</i> NP_390915 with <i>B. licheniformis</i> YP_081282 loop)	2.8 ± 1.4	<i>bceBloopYtsDBI_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	2.4 ± 1.1	nc
<i>BceBloopBceBBh_{ri}</i> (<i>B. subtilis</i> NP_390915 with <i>B. halodurans</i> NP_244782 loop)	2.5 ± 0.5	<i>bceBloopBceBBh_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	2.4 ± 0.9	nc
<i>BceBloopYvcsBs_{ri}</i> (<i>B. subtilis</i> NP_390915 with <i>B. subtilis</i> NP_391349 loop)	1.4 ± 0.2	<i>bceBloopYvcsBs_{ri}</i> , pDG <i>bceR</i>	1.7 ± 1.2	nc

The names of the proteins introduced into *B. subtilis* to completely or partly replace the *B. subtilis* BceAB transporter and the species to which they belong are indicated between brackets on the left of the table. All MSD proteins are members of sub-family IV except NP_391349, which belongs to sub-family III. Strains (ri means that the corresponding ABC transporter was reconstituted/introduced into the appropriate *B. subtilis* background, see Table S2) were grown in medium alone (–IPTG) or in medium containing 1 mM IPTG (+ IPTG) to induce *bceR* expression and then tested to determine their bacitracin resistance in 96-well microtiter trays [22]. At the end of the incubation period, OD at 600 nm was monitored using a TECAN microtiter tray reader. IC₅₀ is defined as bacitracin concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) giving 50% growth inhibition. Results are expressed as mean IC₅₀ values obtained in at least 3 different experiments ± standard deviations. The ratio (IC₅₀ with IPTG (+)/IC₅₀ without IPTG (–)) is given in the case of IC₅₀ values >5 (nc: not calculated).

doi:10.1371/journal.pone.0015951.t001

Table 2. β -Galactosidase specific activity of various *B. subtilis* strains.

Strains	Bacitracin SD	
	0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
BSGY005	0.6 \pm 0.2	39 \pm 11
$\Delta bceAB$	0.6 \pm 0.4	1 \pm 1
<i>bceABBS_{ri}</i>	0.6 \pm 0.3	54 \pm 9
<i>ytsCDBI_{ri}</i>	0.4 \pm 0.1	38 \pm 6
<i>bceABBH_{ri}</i>	0.3 \pm 0.2	2 \pm 1
<i>vraDESa_{ri}</i>	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
<i>vraFGSa_{ri}</i>	0.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1
<i>bceBBSΔloop</i>	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.3
<i>ytsDBIΔloop</i>	0.5 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2
<i>bceBloopBceBBS_{ri}</i>	0.7 \pm 0.2	75 \pm 15
<i>bceBloopYtsDBI_{ri}</i>	0.7 \pm 0.1	10 \pm 4
<i>bceBloopBceBBH_{ri}</i>	0.4 \pm 0.5	0.6 \pm 0.2
<i>bceBloopYvcsBS_{ri}</i>	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2

Strains (see Table 1), containing a *PbceA::lacZ* transcriptional fusion at the *amyE* locus, were grown for 1 hour in LB medium with and without 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of bacitracin as indicated. β -galactosidase specific activities are given as the mean values obtained in at least 3 experiments \pm standard deviations.
doi:10.1371/journal.pone.0015951.t002

fractions by performing Western blot experiments, no BceA protein was recovered in the supernatant obtained after ultracentrifugation (Figure 4, lane 3), but this protein was clearly detected in the pellet corresponding to the membrane fraction (Figure 4, lane 4). The nucleotide binding protein of an ABC transporter interacts tightly and specifically with its MSD membrane partner [27]. Therefore, the fact that BceA was detected in the membrane preparation suggested that the entire BceAB ABC transporter was correctly located in the cytoplasmic membrane despite the absence of the BceB loop.

This strongly suggests that correct localisation of the transporter in the cellular membrane does not require the BceB loop, although the presence of this loop is required to obtain a completely functional ABC transporter for both bacitracin induction and resistance processes in *B. subtilis*.

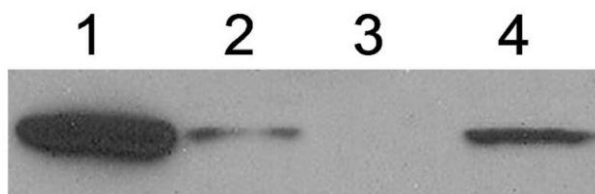


Figure 4. BceA cellular localisation followed by Western blot analysis. The *bceB Δ loop* *pDGbceR* strain was grown in medium containing IPTG (1 mM). Cells were disrupted and subjected to sub-cellular fractionation. Lane 1, crude lysate; lane 2, supernatant resulting from low speed centrifugation; lane 3, supernatant resulting from high speed centrifugation; lane 4, pellet resulting from high speed centrifugation (membrane fraction). Western blots were probed with a rabbit anti-BceA antibody.
doi:10.1371/journal.pone.0015951.g004

The loops of the most homologous BceB are poorly conserved

The question then arose as to whether other loops in subfamily IV ABC transporters involved in responses to bacitracin might play a similar functional role to that of the large extra-cytoplasmic *B. subtilis* BceB loop. When the *B. licheniformis* YtsCD transporter deleted from the MSD large loop was expressed in *B. subtilis*, both the responses and resistance to bacitracin were abolished in the bacterium, which shows that as in the case of *B. subtilis* BceAB, the loop was required to obtain a fully functional ABC transporter (Table 1 and Table 2). We therefore examined the seven closest relatives of BceB, which formed a well defined branch in the MSD tree (i.e. proteins from *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. halodurans*, *B. pumilus*, *G. kaustophilus*, *B. clausii* and *O. iheyensis*, Figure 2) with a view to characterizing their large extra-cytoplasmic loops. The corresponding MSD sequences were aligned using the Muscle software program. The resulting alignment showed that contrary to expectations, the large extracytoplasmic loop (corresponding to O4) was less highly conserved than other regions of these proteins (i.e. other loops or TMS) (Figure S6). To obtain a closer picture, we computed the similarity between BceB from *B. subtilis* and that from the seven other proteins in each region of the proteins. The large extracytoplasmic loop O4 was systematically found to be the least highly conserved element, giving a mean identity of 0.38 \pm 0.1, whereas the values obtained in the other regions ranged between 0.52 \pm 0.13 (O2) and 0.88 \pm 0.07 (TM7) (Figure S7). This finding was at odds with the possible functional or structural importance of the loop.

Did the loop have to be present simply to serve as a particular linker or did it confer its substrate specificity to the ABC transporter? With a view to answering these questions, the BceB loop from *B. subtilis* was replaced by either the *B. licheniformis* YtsD loop, the *B. halodurans* BceB loop or the distantly related *B. subtilis* YvcS loop (subfamily III), using the appropriate strategy for obtaining the *bceBloopBceBBS_{ri}* strain. After introducing the *PbceAB::lacZ* transcriptional fusion at the *amyE* locus, these strains were tested to determine their ability to respond to bacitracin. Except for the *bceBloopBceBBS_{ri}* strain (see above), only the *B. licheniformis* YtsD loop induced partial recovery of the response, whereas both the *B. halodurans* BceB loop and the *B. subtilis* YvcS loop failed to restore the response to bacitracin (Table 2). It is worth noting that the *bceBloopYtsDBI_{ri}* strain overexpressing BceR was not found to be resistant to bacitracin (Table 1) even if the chimeric ABC transporter was membrane detected by western blot experiments (data not shown). These results indicate clearly that a) the functional and/or structural importance of the MSD loop does not depend only on the presence of a protein fragment with an appropriate length b) only the most closely related loop (*B. licheniformis* YtsD loop) partly restored the functional integrity of *B. subtilis* BceB c) the entire BceB MSD loop was required to obtain a completely functional ABC transporter.

Discussion

The results of the present comprehensive study on *B. subtilis* Bce, Yvc and Yxd module homologues in complete genomes clearly show that 1) these modules composed of a two-component signal transduction system (with an intra-membrane sensing HK) combined with an ABC transporter (with an MSD possessing an unusually large extra-cytoplasmic loop) are restricted in Firmicutes with a wide occurrence in this phylum; 2) the four components (RR, HK, NBD and MSD) composing Bce-like modules have co-evolved since they emerged in Firmicutes; 3) the Bce-like module

coding genes have been frequently transferred, duplicated and/or lost during their evolution; and 4) the chromosomal proximity between their respective genes has been highly conserved during evolution.

Based on the detailed phylogenetic analyses performed here, a system of classification of the Bce-like modules into six subfamilies was proposed. Most of the functional data available on Bce-like modules so far have suggested that these modules may be involved in antibiotic resistance mechanisms (against bacitracin, vancomycin, LL-37, enduracidin, etc.). This might explain the crucial role played by horizontal gene transfer and duplication/loss events occurring during their evolutionary history which have led to the emergence of a large repertoire of Bce-like module in some Firmicutes such as pathogenic *Bacillus* or *Clostridia* (Figure S5–S6).

To further investigate the functional links existing between the various components of these modules, we studied several members of the Bce-like subfamily IV, some of whose ABC transporters proved to be involved in bacitracin resistance mechanisms (*B. subtilis* BceRSAB, *S. aureus* VraDE) or to be up-regulated in the presence of bacitracin (*B. licheniformis* YtsCD). The $\Delta bceAB$ *B. subtilis* strain was complemented with genes encoding these modules. In all the bacitracin induction and bacitracin resistance tests performed, the same pattern was consistently observed: the responses of the strains decreased rapidly with the phylogenetic distance between *B. subtilis* BceAB and the replacing ABC transporter. At the induction level, this pattern may be attributed to the need for protein interactions during the process. The ability to interact may indeed decrease when one of the two partners are replaced by a more phylogenetically distant protein. This is in line with our previous suggestion that interactions between one of the BceAB subunits and BceS may activate the HK and induce the response to bacitracin [12]. We have previously described the crucial role of UPP in the response of *B. subtilis* to bacitracin, and suggested that a UPP/bacitracin complex rather than bacitracin alone might participate in the activation of the BceRS system [12]. Undecaprenyl pyrophosphate (UPP) is the bacterial molecular target of bacitracin [28], and its sequestration by the antibiotic leads to the inhibition of peptidoglycan biosynthesis, which is lethal to the bacterium. How does the presence of bacitracin result in BceS kinase activation? As mentioned above, we have hypothesized that interactions may occur between the transporter and the kinase [12]. BceAB might therefore recognize the UPP/bacitracin complex and then make a change of conformation. In this new conformational state, BceAB might interact with and activate BceS. In this case, BceAB would be the first proteins to sense the presence of bacitracin. Might this antibiotic induction mechanism apply to all Bce-like modules? Some of the data available seem to suggest that this is the case: other modules seem to function like the *B. subtilis* Bce module, such as the Yvc module, which requires the presence of the YvcRS ABC transporter to induce a response to enduracidin in *B. subtilis* (our unpublished data). Likewise, in the Bce module from *S. mutans*, the BceAB transporter acts as a bacitracin co-sensor with the BceRS two-component [16]. Also, the *S. aureus* GraRS signal transduction system up-regulates the expression of the genes coding for the VraFG ABC transporter in the presence of vancomycin, and this process seems to require the presence of at least VraG [20].

Despite the fairly high levels of membrane expression of the various ABC transporters, their ability to protect bacteria from bacitracin decreases or is lost when they are expressed under heterologous conditions. Differences in the cellular context, such as changes in the peptidoglycan structure or the protein environment, might explain this finding. For instance, the VraDE transporter, which was previously found to participate in *S. aureus*

bacitracin resistance, fails to complement BceAB in *B. subtilis*, whereas *B. licheniformis* YtsCD and *B. halodurans* BceAB, two closer homologues of BceAB, at least partly restore bacitracin resistance in *B. subtilis*. It is worth mentioning that these are the first experimental data supporting the putative contribution of these two transporters to bacitracin resistance in their respective genuine bacterial hosts. The up-regulation of *B. licheniformis* ytsC gene found to occur in the presence of bacitracin in both *B. licheniformis* DSM13 and ATCC10716 strains supports these findings [26]. At least four ABC transporters belonging to subfamily IV recognize bacitracin as a substrate: BceABBs, YtsCDBI, BceABBh and VraDESa [26 and the present results]. This specificity is not restricted to subfamily IV, since BceAB (NP_721401, NP_721402) in *Streptococcus mutans*, YP_001835606 and YP_001835607 in *Streptococcus pneumoniae*, both of which belong to subfamily II, and the subfamily V AnrAB proteins (NP_465638, NP_465639) from *Listeria monocytogenes* confer bacitracin resistance on their respective bacterial hosts [16,17,18,19,21]. This indicates that very distantly related modules can have the same specificity. In addition, members of the same subfamily can have different specificities, such as VraFGSa, which belongs to subfamily IV and was found to contribute to vancomycin resistance in *S. aureus* [20]. These data indicate that the antibiotic recognized by each Bce-like module may be difficult to predict on the basis of phylogenomic data, with the exception of some very close relatives. However, the fact that the target of all the antibiotics involved in known modules is the bacterial cell envelope constitutes a common feature among all of them.

The specificity of the ABC transporter is puzzling because it raises questions about the recognition of the antibiotic by the MSD. This specificity can be either restricted, as in the case of the *B. subtilis* BceAB transporter, which specifically recognizes bacitracin, based on our previous results [24] or very broad, as in the case of the BceAB from *S. mutans*, the *S. pneumoniae* YP_001835606/YP_001835606 ABC transporter and the *L. monocytogenes* AnrAB transporter, all of which recognize several antibiotics [18,19,21]. Interestingly, some Firmicutes seem to have acquired multi-antibiotic resistant ABC transporter as the result of either gene duplication, horizontal gene transfer and/or recombination events leading to the extension of the Bce-like module's repertoire. This seems to have already occurred in some bacteria, especially in human pathogenic bacteria such as *S. mutans* and *S. pneumoniae* (see above) or *B. cereus* and *B. anthracis* (Figures 2 and S4), which suggests that they are better equipped to resist several antibiotics.

Upon examining the sequence of the *B. subtilis* BceB's closest homologues belonging to subfamily IV, we noted that the loop is the least conserved domain. This contrasts with our finding that the presence of the loop is required not only for induction but also for antibiotic resistance processes. When the *B. subtilis* BceB loop was replaced by loops from subfamily IV ABC transporters with the same specificity, none of the heterologous ABC transporter loops was found to restore bacitracin resistance to this bacterium. Although the loop might be required for the proper folding and activity of the transporter to occur, the possibility that it might have a more specific function cannot be ruled out. Indeed, the most closely related loop (the *B. licheniformis* YtsCD loop) partially restored the bacitracin response in the *B. subtilis* BceB Δ loop strain. The occurrence of interactions between the loop and some other domain(s) in the transporter might explain the latter result and in this context, phylogenetically distantly related loops might lose their ability to take part in these interactions. Large extracytoplasmic loops have been previously found to be involved in specific functions in an ABC transporter belonging to the exporter family

in the case of *E. coli*, where LolC and LolD along with the LolD NBD constitute the LolCDE ABC transporter. This transporter carries out the first step in lipoprotein transport from the inner to the outer membrane of the Gram negative bacteria [29]. It has been predicted that LolE and LolC each contain four TMS and a large extracytoplasmic loop located between TMS number 1 and 2. These loops interact directly with lipoproteins and are involved in their transfer to the LolA periplasmic molecular chaperone [30,31]. It therefore seems possible that the BceB-like loops might also constitute important functional domains for the corresponding ABC transporter.

Conclusions

The results obtained throughout the present study consistently indicate that Bce-like modules are involved in resistance mechanisms against antibiotics targeting the membrane. The data obtained here, along with those available in the literature, suggest that a common mechanism of action is involved. These modules include an ABC transporter possessing a translocator with a very large extracytoplasmic loop, which seems to be functionally and/or structurally required by all of them. In addition, the translocator seems to act as the primary antibiotic sensor, which transfers the information it detects to the histidine kinase. This unusual mode of functioning makes these particular Bce-like modules interesting targets for further studies. Better knowledge about this resistance mechanism and how these modules developed and spread in Firmicutes might provide interesting clues to designing more appropriate means of treating diseases due to pathogens belonging to this bacterial phylum.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Tables S2 and S3, respectively. The sequence of each recombinant plasmid was checked by DNA sequencing (Cogenics). *B. subtilis* strains were grown in Luria broth (LB) at 37°C with aeration. The pDG148*bceR* plasmid [32] was used to induce over-expression of BceR in *B. subtilis*. IPTG was also added at a final concentration of 1 mM when necessary. Recombinant strains were grown in medium containing antibiotics at the following concentrations: chloramphenicol (5 µg.ml⁻¹), tetracycline (10 µg.ml⁻¹) and spectinomycin (100 µg.ml⁻¹). Bacitracin and all other antibiotics were from Sigma-Aldrich.

General Molecular Biology Techniques

Unless otherwise stated, all molecular biology procedures were carried out as described in [33]. DNA fragments were purified using the Qiaquick nucleotide removal kit (Qiagen). Cloning of DNA was performed in *E. coli* DH5 α strain. PrimeSTAR (Takara Bio. Inc.) was used to perform PCR amplifications in a final volume of 50 µl under the conditions recommended by the manufacturer. Plasmid purifications were carried out using either Plasmid Midi Kit or Plasmid Mini Kit from Qiagen.

All the oligonucleotides used in this study are listed in Table S4.

Plasmid and strain construction procedure

General strategy for *bceAB* deletion, ABC transporter gene introduction and loop exchange in *B. subtilis*. Three plasmids were designed and produced, each containing a *bceAB* DNA flanking region so that a DNA fragment could be either deleted or inserted at this locus by inducing a double recombination event.

1) The pbTy plasmid was obtained by cloning a three partner PCR product into the pGEM-T vector (Promega). PCR products were obtained as follows: PCR1 fragment (351 base pairs (bp)), comprising in the following order part of the *bceA* promoter, the *bceA* start codon followed by 6 histidine encoding codons, a *PmlI* restriction site (CACGTG, where CAC is the last histidine codon) and an *AcsI* restriction site (GGCGCGCC), was obtained using Pbcca1 and Pbcca2-ml primers. The 401 bp long PCR3 fragment including the end of the *bceB* gene and the beginning of the *yttA* gene was obtained using yttA1-tet and yttA2 primers. *B. subtilis* genomic DNA was used as a template in both cases. PCR2, which corresponds to a tetracycline resistance cassette, was obtained using Tet1-asc and Tet2-lin primers with the pDG1515 plasmid as a template [34]. PCR1/PCR2 and PCR2/PCR3 possess 20-bp and 24-bp long fragments, respectively, with identical sequences, so that amplification can be performed using pbcca1 and yttA2 as primers with a mixture of the three fragments at an equimolecular ratio. *PmlI*, *AcsI* and *BstEII* (end of the Tet cassette) are unique restriction sites in pbTy.

The pbTy vector was used to construct the pbSy vector (see below) and to clone entire ABC transporter genes at *PmlI/AcsI* sites in order to replace *bceAB* genes.

2) The pbSy plasmid was obtained from pbTy by replacing the tetracycline cassette by a spectinomycin cassette. The latter was obtained by performing PCR amplification using spec-asc and spec-bst primers and pDG1726 as a template [34]. After digestion with *AcsI/BstEII*, the cassette was cloned into the *AcsI/BstEII* pbTy digested plasmid, giving the pbSy plasmid. The latter was used to obtain a $\Delta bceAB$ mutant in *B. subtilis* via a double recombination event.

3) The pbTy*bceAB* Δ loop plasmid was obtained from the pbTy plasmid. A DNA fragment comprising *bceA* gene and the *bceB* gene with the loop deleted was obtained as follows: using *B. subtilis* genomic DNA as template and bceABBs-pml with loop1/FseBbv or loop2/FseBbv with bceABBs-asc as pairs of primers, we obtained PCR4 and PCR5 fragments respectively. Since these fragments had identical 21-bp fragments, double partner amplification was performed with PCR4 and PCR5 as templates (in a 1/1 molar ratio) using bceABBs-pml and bceABBs-asc as primers. After a digestion step with *PmlI* and *AcsI*, the PCR fragment was cloned into the *PmlI*, *AcsI* digested pbTy plasmid, giving the pbTy*bceAB* Δ loop plasmid. As the cloned fragment contained two restriction sites (*FseI*, *BbvCI*) replacing the loop encoding sequence, which were not present in the pbTy plasmid, a loop encoding sequence could be reintroduced. By reintroducing the BceB loop in this way, three additional amino acids were introduced on both sides of the loop (GLS and VLS) in comparison with the wild type sequence. The pbTy*bceAB* Δ loop plasmid was also used to obtain the *bceB* Δ loop strain from the *bceAB* mutant via a double recombination event.

Cloning of ABC transporter genes into the pbTy plasmid and reintroducing the genes into *B. subtilis*. *bceAB* from *B. subtilis*, *ytsCD* from *B. licheniformis*, *bceAB* from *B. halodurans*, *vraDE* and *vraFG* from *S. aureus*, genes were obtained by PCR amplification using bceABBs-pml/bceABBs-asc, ytsCDBI-pml/ytsCDBI-asc, bceABBh-pml/bceABBh-asc, vraDE-PmlI/vraDE-asc and vraFG-PmlI/vraFG-asc as pairs of primers, respectively, with the corresponding genomic DNAs as templates. Each amplification product was *PmlI/AcsI* double digested and cloned in the *PmlI/AcsI* double digested pbTy plasmid. Each of the resulting plasmids was used to reintroduce the *B. subtilis* *bceAB* genes, *B. licheniformis* *ytsCD* genes, *B. halodurans* *bceAB* genes, *S. aureus* *vraDE* and *S. aureus* *vraFG* genes into the *B. subtilis* *bceAB*

mutant, giving the *bceABB_{tri}*, *ytsCDBL_{tri}*, *bceABB_{tri}*, *vraDESa_{tri}* and *vraFGSa_{tri}* strains, respectively.

Cloning of sequences encoding MSD loops into the pbTybceABΔloop plasmid and reintroducing the corresponding ABC transporter genes into *B. subtilis*. *bceBBs*, *ytsDBL* or *bceBBL* loop sequences were obtained by performing PCR amplification using loop-BceBBs_{fse}/loop-BceBBs_{bbv}, loop-ytsD-BL_{fse}/loop-ytsD-BL_{bbv} and loop-BceBBh_{fse}/loop-BceBBh_{bbv} pairs of primers, respectively, with the corresponding genomic DNAs as templates. Each amplification product was *FseI*/*BbsCI* double digested and cloned into the *FseI*/*BbsCI* double digested pbTybceABΔloop plasmid. Each of the resulting plasmids was used to reintroduce either the BceBBs loop, the YtsCDBL loop or the BceBBh loop into the Δ*bceAB* strain, giving the *bceBloopBceBBs_{tri}*, *bceBloopYtsCDBL_{tri}*, and *bceBloopBceBBh_{tri}* strains.

Using this general strategy, all the strains except the Δ*bceAB* strain expressed a BceA protein possessing a 6-his N terminal tag making detection by His-probing proteins possible if required.

β-galactosidase assay

The procedure used here has been previously described [12].

Measurement of bacitracin resistance

The antibiotic concentration of giving 50% growth inhibition (IC₅₀) was determined using the microtiter tray assay described previously [22].

Cell lysate and membrane preparation

The procedure used here has been previously described [35].

Western blot experiments

Proteins were separated by performing SDS-page and the gels were blotted onto Hybond ECL paper (Amersham Biosciences) using a semi-dry transfer apparatus (Bio-rad) in line with the manufacturer's recommendations. BceA protein was detected either with a rabbit polyclonal anti-BceA antibody and a second antibody (mouse anti-rabbit Ig coupled to horse radish peroxidase from Sigma-Aldrich) or with a His-probe Horseradish peroxidase (super signal west Hisprobe kit from Thermo Scientific). In both cases, the SuperSignal West Pico chemoluminescent substrate from Pierce was used in line with the manufacturer's recommendations.

Bioinformatic analysis

Homologues of the four components of the *B. subtilis* Bce-modules were retrieved from the 779 complete genomes available in February 2009 at the NCBI using the BLASTp program [36]. Sequences from the Bce-module of *B. subtilis* (i.e. BceR (O34951) 231 amino acids, BceS (O35044) 334 amino acids, BceA (O34697) 253 amino acids, BceB (O34741), 646 amino acids) were used as seeds.

The sequences retrieved were aligned using the MUSCLE software program [37]. Resulting alignments were inspected visually and refined manually using the MUST software program [38]. Regions where alignment was doubtful were removed before the phylogenetic analyses were carried out using MUST.

Phylogenetic analyses were performed using the Maximum Likelihood method implemented in PHYML [39], with the Le and Gascuel model (LG model) including an estimated proportion of invariant sites and a correction by a Γ-law to account for rate among site variations (four categories of sites, an estimated alpha parameter). Refined phylogenetic analyses were performed on each Bce-like component, using a reduced taxonomic sampling method, where only one strain was conserved in each species. The

Bayesian method implemented in MrBayes 3.0B4 [40] was used with a mixed model based on amino acid substitution and a Γ-law (four discrete categories plus a proportion of invariant sites) to account for among site rate variation. MrBayes was run with four chains for 1 million generations and trees were sampled every 100 generations. To construct the consensus tree, the first 1500 trees were discarded as burning.

Lastly, the TM segments of the BceS and BceB homologues were investigated using the filter_tmhmmv2.pl program (C. Brochier-Armanet, unpublished). Sequences were sorted depending on their length, the number of TMs, the position and the length of their extracytoplasmic loops. Among the 578 BceS homologs, we searched for sequences having a length ranging from 50 to 1000 amino acids, exactly two TM segments and a short loop (i.e. composed of 1–20 amino acids) located between the first and second TM segments. In the case of 314 BceB homologs, we examined sequences having a length ranging from 400 to 1000 amino acids, exactly ten TM segments and a long loop (i.e. composed of 100–400 amino acids) located between the seventh and eighth TM segments.

Supporting Information

Figure S1 Phylogeny of BceS homologues. Maximum Likelihood tree showing the 579 BceS homologues retrieved from complete genomes. Sequences with the name in green correspond to kinases that harbour exactly 2 TM separated by a short linker (<12 amino acids), whereas sequences with the name in orange correspond to BceS with different characteristics (more or less TM, longer linker, etc). The great majority of these sequences are clustered together, which indicates that this characteristic was present in the ancestor and conserved during the evolution of this group. The few sequences outside the clusters correspond to sporadic convergences occurring during the evolution of this large family. The scale bar gives the average number of substitutions per site.

(PDF)

Figure S2 Phylogeny of BceB homologues. Maximum likelihood tree showing the 314 BceB homologues retrieved from complete genomes. Sequences with the name in green correspond to MSD that harbour exactly 10 TM, and TM7 and TM8 are separated by a long extracytoplasmic loop (>197 amino acids), whereas sequences with the name in orange correspond to BceB with different characteristics (more or less TM, longer linker, etc). The scale bar gives the average number of substitutions per site.

(PDF)

Figure S3 Phylogeny of the BceS-like proteins (kinase components). Bayesian tree showing the relationships in a subsample of 98 BceS sequences. The accession number of each sequence is provided. Numbers at nodes are posterior probabilities. The scale bar gives the average number of substitutions per site. For details about colours and symbols, see the legend to Figure 5. The length of the alignment used to construct the tree was 171 residues.

(PDF)

Figure S4 Phylogeny of the BceA-like proteins (NBD components). Bayesian tree showing the relationships in a subsample of 152 BceA sequences. The accession number of each sequence is provided. Numbers at nodes are posterior probabilities. The scale bar gives the average number of substitutions per site. For details about colours and symbols, see the legend to Figure 5. The length of the alignment used to construct the tree

was 205 residues. BceA-like proteins used for recombinant strain construction were indicated in bold characters.
(PDF)

Figure S5 Bce-like repertoires. Type and distribution of Bce-like systems in the four main Firmicutes lineages: (A) Clostridiales, (B) Bacillales, (C) Mollicutes and (D) Lactobacillales. For details about symbols and colours, see the legend of Figure 5.
(TIF)

Figure S6 Alignment of the *B. subtilis* BceB sequence with its seven closest relatives belonging to subfamily IV. Regions designated by I1 to I6 are intracellular segments, those annotated O1 to O5 correspond to extracellular loops (O4 is the large loop), and TM stands for transmembrane segments. In the line entitled “Clustal Consensus”, stars correspond to positions harbouring residues that are different but that have similar features. In this alignment, the region corresponding to O4 is the least highly conserved.
(TIF)

Figure S7 Similarities between *B. subtilis* BceB regions and those of the closest BceB-like homologs. The Y axis gives the evolutionary distances and the X axis gives the domain of interest in the BceB-like proteins. Whole: entire proteins, I: intracytoplasmic domains, TM: transmembrane segments, O: extracytoplasmic or outside domains. SD Numbering of the domains corresponds to the predicted topology of BceB-like proteins (Figure S6). In each region of the proteins, the mean distance between the *B. subtilis* BceB transporter and the seven most closely related BceB-like proteins belonging to subfamily IV (proteins from *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. halodurans*, *B.*

pumilus, *G. kaustophilus*, *B. clausii* and *O. iheyensis*) is indicated. Error bars correspond to standard deviations.
(TIF)

Table S1 Diversity and organisation of bce-like components in each complete genome. Kinases are shown in yellow, regulators in red, NBDs in green, MSDs in blue to and non Bce-like proteins in grey. Light colors correspond to pseudogenes or misannotated genes that have been manually detected using tblastn with complete genomes. For each gene cluster, the name of the subfamily to which it belongs is indicated.
(XLS)

Table S2 Bacterial strains used in this study.
(PDF)

Table S3 Plasmids used in this study.
(PDF)

Table S4 List of oligonucleotides used in this study.
(PDF)

Acknowledgments

The authors greatly appreciate helpful discussions with Dr Vincent Méjean.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SCF CBA AG FD MF. Performed the experiments: SCF CBA AG FD. Analyzed the data: SCF CBA FD MF. Contributed reagents/materials/analysis tools: SCF CBA AG FD. Wrote the paper: SCF CBA FD MF.

References

- Mascher T (2006) Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 264: 133–144.
- Parkinson JS, Kofoid EC (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* 26: 71–112.
- Stock J, Surette M, Levit M, Par P (1995) Two-component signal transduction systems: structure-function, relationships and mechanism of catalysis. Washington DC: ASM Press.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69: 183–215.
- Tetsch L, Jung K (2009a) The regulatory interplay between membrane-integrated sensors and transport proteins in bacteria. *Mol Microbiol* 73: 982–991.
- Tetsch L, Jung K (2009b) How are signals transduced across the cytoplasmic membrane? transport proteins as transmitter of information. *Amino Acids* 37: 467–477.
- Ren Q, Kang KH, Paulsen IT (2004) TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res* 32: D284–288.
- Ames GF (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu Rev Biochem* 55: 397–425.
- Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448–450.
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67–113.
- Tomii K, Kanehisa M (1998) A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res* 8: 1048–1059.
- Bernard R, Guiseppe A, Chippaux M, Foglino M, Denizot F (2007) Resistance to bacitracin in *Bacillus subtilis*: unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes. *J Bacteriol* 189: 8636–8642.
- Quentin Y, Fichant G, Denizot F (1999) Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J Mol Biol* 287: 467–484.
- Rietkötter E, Hoyer D, Mascher T (2008) Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 68: 768–785.
- Upton M, Tagg JR, Wescombe P, Jenkinson HF (2001) Intra- and interspecies signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides. *J Bacteriol* 183: 3931–3938.
- Ouyang J, Tian X, Versey J, Wishart A, Li Y (2010) The BceABRS Four-Component System Regulates Bacitracin-Induced Cell Envelope Stress Response in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* (published ahead of print on 6 July 2010. doi:10.1128/AAC.01802-09).
- Tsuda H, Yamashita Y, Shibata Y, Nakano Y, Koga T (2002) Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3756–3764.
- Becker P, Hakenbeck R, Henrich B (2009) An ABC transporter of *Streptococcus pneumoniae* involved in susceptibility to vancomycin and bacitracin. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2034–2041.
- Majchrzykiewicz JA, Kuipers OP, Bijlsma JJE (2010) Generic and specific adaptive responses of *Streptococcus pneumoniae* to challenge with three distinct antimicrobial peptides, bacitracin, ll-37, and nisin. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 440–451.
- Meehl M, Herbert S, Götz F, Cheung A (2007) Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2679–2689.
- Collins B, Curtis N, Cotter PD, Hill C, Ross RP (2010) The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin, and various beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 4416–4423.
- Ohki R, Giyanto, Tateno K, Masuyama W, Moriya S, et al. (2003) The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49: 1135–1144.
- Mascher T, Margulis NG, Wang T, Ye RW, Helmann JD (2003) Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol* 50: 1591–1604.
- Bernard R, Joseph P, Guiseppe A, Chippaux M, Denizot F (2003) YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 228: 93–97.
- Wecke T, Veith B, Ehrenreich A, Mascher T (2006) Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. *J Bacteriol* 188: 7500–7511.
- Pietäniemi M, François P, Hyryläinen H, Tangomo M, Sass V, et al. (2009) Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of VraDE and VraSR in antimicrobial resistance. *BMC Genomics* 10: 429.

27. Liu PQ, Ames GF (1998) In vitro disassembly and reassembly of an ABC transporter, the histidine permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3495–3500.
28. Stone KJ, Strominger JL (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 3223–3227.
29. Narita S, Tokuda H (2006) An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Lett* 580: 1164–1170.
30. Yakushi T, Masuda K, Narita S, Matsuyama S, Tokuda H (2000) A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat Cell Biol* 2: 212–218.
31. Okuda S, Tokuda H (2009) Model of mouth-to-mouth transfer of bacterial lipoproteins through inner membrane LolC, periplasmic LolA, and outer membrane LolB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5877–5882.
32. Joseph P, Fantino JR, Herbaud ML, Denizot F (2001) Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 205(1): 91.7.
33. Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor, New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
34. Guérout-Fleury AM, Shazand K, Frandsen N, Stragier P (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* 167: 335–336.
35. Bernard R, El Ghachi M, Mengin-Lecreux D, Chippaux M, Denizot F (2005) BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem* 280: 28852–28857.
36. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
37. Edgar RC (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792–1797.
38. Philippe H (1993) Must, a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nucleic Acids Res* 21: 5264–5272.
39. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696–704.
40. Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.

Les données supplémentaires sont accessibles sur :

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015951>

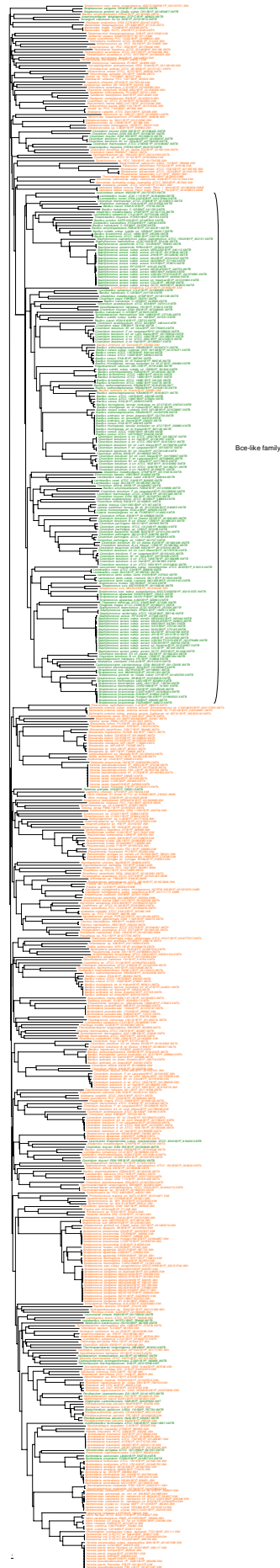


Figure S1 : Phylogénie des homologues de BceS.

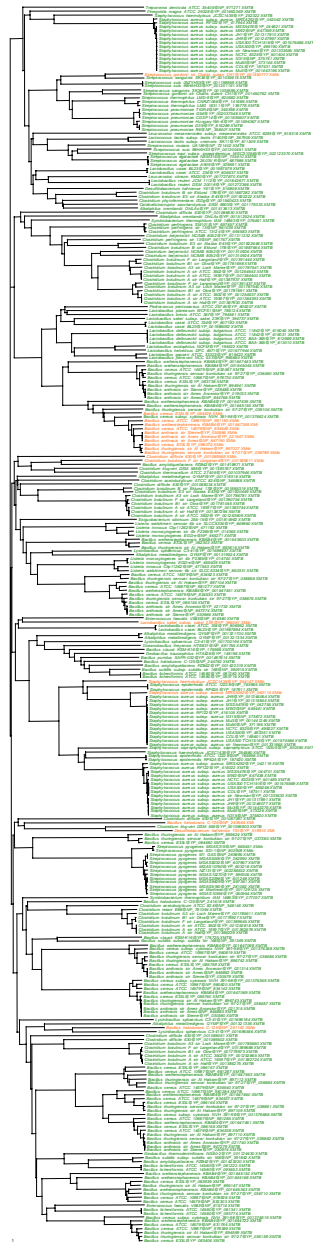


Figure S2 : Phylogénie des homologues de BceB.

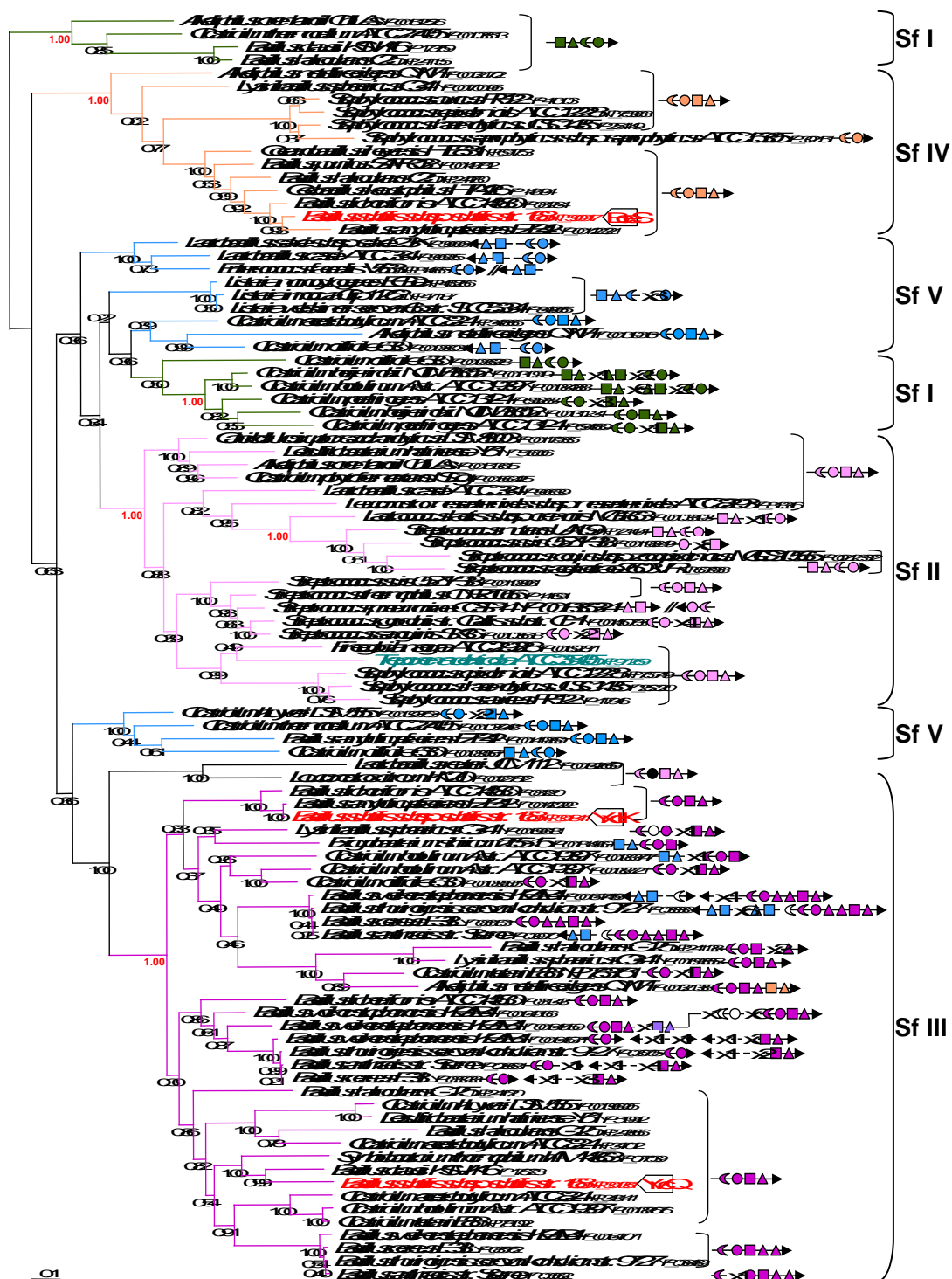


Figure S3 : Phylogénie des protéines BceS-like (histidine kinase).

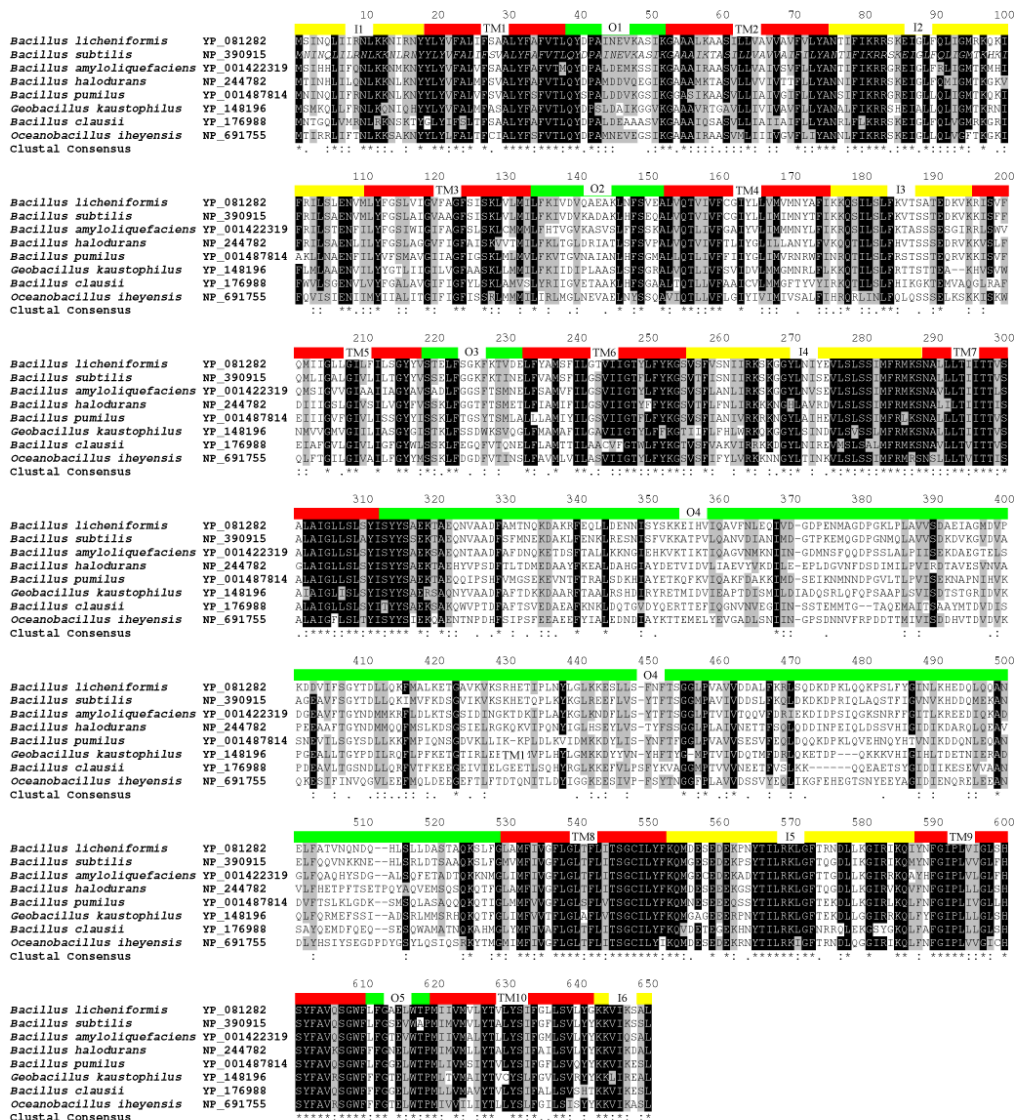


Figure S6 : Alignement de la séquence de BceB de *B. subtilis* avec sept de ses plus proches homologues appartenant à la sous-famille IV.

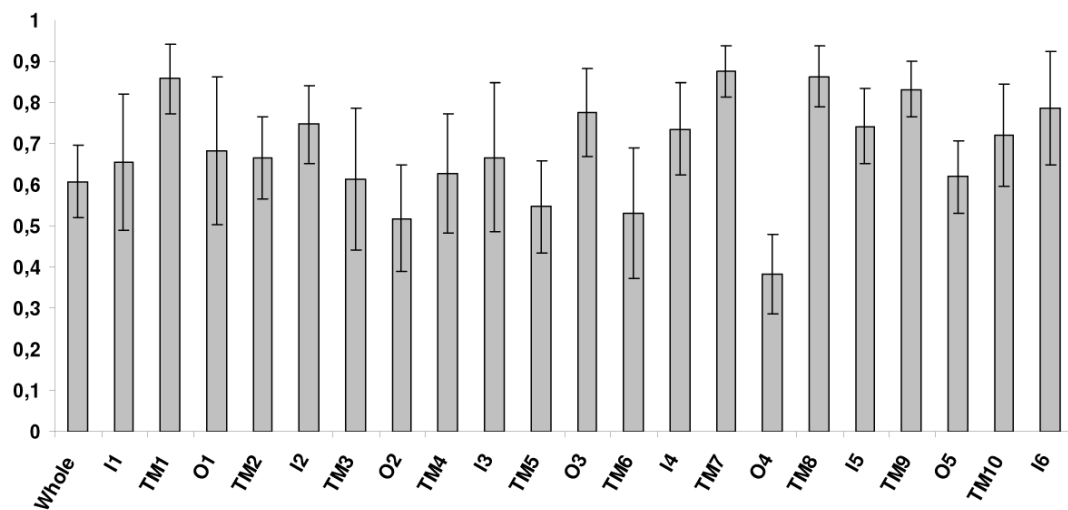


Figure S7 : Similarités entre les régions de BceB de *B. subtilis* et celles de ses plus proches homologues.

Firmicutes

441768	Acholeplasma laidlawii PG-8A					
293826	Alkaliphilus metalliredigens QYMF	Group IV (light orange)/Group IV (light orange)	YP_001321334	YP_001321335	YP_001321336	YP_001321337
293826	Alkaliphilus metalliredigens QYMF	Group V (blue)	YP_001321703	YP_001321702	YP_001321701	YP_001321700
293826	Alkaliphilus metalliredigens QYMF	Group V (blue)	YP_001319315	YP_001319316	YP_001319317	YP_001319318
293826	Alkaliphilus metalliredigens QYMF	Group V (blue)	YP_001319523	YP_001319524		
350688	Alkaliphilus oremlandii OhILAs	Group II (light pink)	YP_001513616	YP_001513615	YP_001513614	YP_001513613
350688	Alkaliphilus oremlandii OhILAs	Group I (light green)	YP_001512526	YP_001512525	YP_001512524	YP_001512523
491915	Anoxybacillus flavithermus WK1					
322098	Aster yellows witches'-broom phytoplasma AYWB					
326423	Bacillus amyloliquefaciens FZB42	Group III (dark pink)	YP_001423223	YP_001423222	YP_001423221	YP_001423220
326423	Bacillus amyloliquefaciens FZB42	Group IV (light orange)	YP_001422322	YP_001422321	YP_001422320	YP_001422319
326423	Bacillus amyloliquefaciens FZB42	Group V (blue)	YP_001419868	YP_001419869	YP_001419870	YP_001419871
261594	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor'	Group III (dark pink)	YP_021319	Unannotated	YP_021316	YP_021315
261594	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor'	Group V (blue)/Group II (dark pink)	YP_021732	YP_021733	COG2207K	YP_021735 (GBAA5)
261594	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor'	Group III (dark pink)	Unannotated + FS	YP_019244	HP	COG1670J
261594	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor'	Group VI (purple)	YP_021648	YP_021647		
261594	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor'	Group VI (purple)	Unannotated + FS	YP_019033		
198094	Bacillus anthracis str. Ames	Group III (dark pink)	NP_846885	Unannotated	NP_846884	NP_846883
198094	Bacillus anthracis str. Ames	Group V (blue)/Group II (dark pink)	NP_847274	NP_847275	COG2207K	NP_847277
198094	Bacillus anthracis str. Ames	Group III (dark pink)	Unannotated + FS	NP_844966	HP	COG1670J
198094	Bacillus anthracis str. Ames	Group VI (purple)	NP_847191	NP_847190		
198094	Bacillus anthracis str. Ames	Group VI (purple)	Unannotated	NP_844768		
260799	Bacillus anthracis str. Sterne	Group III (dark pink)	YP_030584	HP (70 aa)	YP_030582	YP_030581
260799	Bacillus anthracis str. Sterne	Group V (blue)/Group II (dark pink)	YP_030966	YP_030967	COG2207K, COG37	YP_030969
260799	Bacillus anthracis str. Sterne	Group III (dark pink)	YP_028689-8	YP_028687	HP	COG1670J
260799	Bacillus anthracis str. Sterne	Group VI (purple)	YP_030887	YP_030886		
260799	Bacillus anthracis str. Sterne	Group VI (purple)	YP_028484-5	YP_028486		
222523	Bacillus cereus ATCC 10987	Group III (dark pink)	NP_980824	NP_980823	NP_980821	NP_980820
222523	Bacillus cereus ATCC 10987	Group III (dark pink)	NP_981282	NP_981283	NP_981284	NP_981285
222523	Bacillus cereus ATCC 10987	Group III (dark pink)	NP_978923	NP_978924	HP	COG0488R
222523	Bacillus cereus ATCC 10987	Group VI (purple)	NP_981181	NP_981180		
222523	Bacillus cereus ATCC 10987	Group VI (purple)	NP_978729	NP_978730		
222523	Bacillus cereus ATCC 10987	Group V (blue)	NP_981278	NP_981277		
222523	Bacillus cereus ATCC 10987	Group III (dark pink)	NP_978389			
226900	Bacillus cereus ATCC 14579	Group III (dark pink)	NP_834145	NP_834144	NP_834143	NP_834142
226900	Bacillus cereus ATCC 14579	Group III (dark pink)	NP_834535	NP_834536	NP_834537	NP_834538
226900	Bacillus cereus ATCC 14579	Group III (dark pink)	NP_832297	NP_832298	HP	COG0488R
226900	Bacillus cereus ATCC 14579	Group VI (purple)	NP_832086	NP_832087		
226900	Bacillus cereus ATCC 14579	Group VI (purple)	NP_834447	NP_834446		
226900	Bacillus cereus ATCC 14579	Group V (blue)	NP_834531	NP_834530		
226900	Bacillus cereus ATCC 14579	Group V (blue)	NP_834524-5	NP_834523		
226900	Bacillus cereus ATCC 14579	Group III (dark pink)	NP_831764			
288681	Bacillus cereus E33L	Group III (dark pink)	YP_085763	YP_085762	YP_085761	YP_085760
288681	Bacillus cereus E33L	Group III (dark pink)	YP_086162	YP_086163	YP_086164	YP_086165
288681	Bacillus cereus E33L	Group III (dark pink)	YP_083932	YP_083933	HP	COG0488R
288681	Bacillus cereus E33L	Group VI (purple)	YP_083737	YP_083738		
288681	Bacillus cereus E33L	Group VI (purple)	YP_086071	YP_086070		
288681	Bacillus cereus E33L	Group VI (purple)	YP_084430	YP_084429		
288681	Bacillus cereus E33L	Group V (blue)	YP_084479	YP_084480		
288681	Bacillus cereus E33L	Group V (blue)	YP_086156	YP_086155		
288681	Bacillus cereus E33L	Group III (dark pink)	YP_083406			
288681	Bacillus cereus E33L	Group V (blue)	YP_082303			
288681	Bacillus cereus E33L	Group III (dark pink)	YP_245668			
315749	Bacillus cereus subsp. cytotoxis NVH 391-98	Group III (dark pink)	YP_001376372	YP_001376371	YP_001376370	YP_001376369
315749	Bacillus cereus subsp. cytotoxis NVH 391-98	Group III (dark pink)	YP_001376686	YP_001376687	YP_001376688	YP_001376689

Table S1: Diversité et organisation des modules *bce*-like dans chaque génome complet. Seule la première page du tableau est ici représenté. Le tableau dans son ensemble est disponible le sur : <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015951>

Table S2: Bacterial strains used in this study.

Strains	Genotype	Antibiotic resistance	Origin
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F- φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA</i> – <i>argF</i>) <i>U169</i> <i>deoR recA1endA1 hsdR17 phoA supE44</i> <i>λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>		In vitro
<i>B. licheniformis</i> DSM 13 (ATCC 14580)			DSMZ
<i>B. halodurans</i> DSM 18197 (ATCC BAA-125)			DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>		Anagnostopoulos and Spizizen 1961
BSmrs 111 (168, pDGbceR)	168, pDGbceR	Km ^r	Joseph et al. 2002
BSGY005	168, <i>amyE::PbceA::lacZ</i>	Cm ^r	Ohki et al. 2003
BSmrs 203 (pDGbceR)	BSGY005, pDGbceR	Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 293 (ΔbceAB)	BSGY005, <i>PbceA::spc::yttA</i>	Spc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 297 (ΔbceAB, pDGbceR)	293, pDG148bceR	Spc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 294 (bceABB_{S₁₁})	BSGY005, <i>PbceA::his6-bceABBs::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 298 (bceABB_{S₁₃}, pDGbceR)	294, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 313 (ytsCDBI₁₁)	BSGY005, <i>PbceA::his6-ytsCDBI::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 318 (ytsCDBI₁₁, pDGbceR)	313, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 312 (bceABB_{H₁₁})	BSGY005, <i>PbceA::his6-bceABBh::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 317 (bceABB_{H₁₁}, pDGbceR)	312, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 357 (vraDESa₁₁)	BSGY005, <i>PbceA::his6-vraDESa::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 361 (vraDESa₁₁, pDGbceR)	357, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 358 (vraFGSa₁₁)	BSGY005, <i>PceA::his6-vraFGSa::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 362 (vraFGSa₁₁, pDGbceR)	358, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 295 (bceBBsΔloop)	BSGY005, <i>PbceA::his6-bceABBsΔloop::ytttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 299 (bceBBsΔloop, pDGbceR)	295, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 336(ytsDBIΔloop)	BSGY005, <i>PbceA::his6-ytsCDBIΔloop::ytttA</i>		
BSmrs 337(ytsDBIΔloop, pDGbceR)	336, pDGbceR		
BSmrs 296 (bceBloopBceBB_{S₁₁})	BSGY005, <i>PbceA::his6-bceABBsloopBceBBs₁₁::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 300 (bceBloopBceBB_{S₁₁}, pDGbceR)	296, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 315 (bceBBsloopYtsDBI₁₁)	BSGY005, <i>PbceA::his6-bceABBs loopYtsDBI₁₁::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 320 (bceBBsloopYtsDBI₁₁, pDGbceR)	315, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 314 (bceBBsloopBceBB_{H₁₁})	BSGY005, <i>PbceA::his6-bceABBs loopBceBBh₁₁::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 319 (bceBBsloopBceBB_{H₁₁}, pDGbceR)	314, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work
BSmrs 316 (bceBBsloopYvcSB_{S₁₁})	BSGY005, <i>PbceA::his6-bceABBs loop YvcSBs₁₁::yttA</i>	Tc ^r , Cm ^r	This work
BSmrs 321 (bceBBsloopYvcSB_{S₁₁}, pDGbceR)	316, pDGbceR	Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	This work

To facilitate understanding strain names indicated in bold characters are used throughout the text and tables.

Anagnostopoulos C, Spizizen J. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**: 741-746.
 Joseph P, Fichant G, Quentin Y, Denizot F. 2002. Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *bacillus/clostridium* group, suggest a functional link between them. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 503-513.
 Ohki R, Giyanto, Tateno K, Masuyama W, Moriya S, Kobayashi K, Ogasawara N. 2003. The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**: 1135-1144.

Table S2: Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Table S3: Plasmids used in this study

Plasmids	Features, resistance	Références
pDG <i>bceR</i>	IPTG inducible <i>bceR</i> expression, Ap ^r , Km ^r	Joseph et al. 2002
pbSy	Ap ^r , Spc ^r	This work
pbTy	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>bceAB</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>ytsCDBI</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>bceABBh</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>vraDESa</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>vraFGSa</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>bceABBSΔloop</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>ytsCDBIΔloop</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>bceA, bceBloopBceBBs</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>bceA, bceBloopYtsDBI</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>bceA, bceBloopBceBBh</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work
pbTy <i>bceA, bceBloopYvcSBs</i>	Ap ^r , Tc ^r	This work

Joseph P, Fichant G, Quentin Y, Denizot F. 2002. Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *bacillus/clostridium* group, suggest a functional link between them. J Mol Microbiol Biotechnol 4: 503-513.

Table S3: Plasmides utilisés dans cette étude.

Table S4: List of oligonucleotides used in this study

Name	Sequence
Pbcea1	5'-GGGCATTGATCCAAAAGATGTACC-3'
Pbcea2-pml	5'-CGCCC ACGTGATGATGATGATGGTGCATTTACGCAG TCTCCTTTAATTG-3'
Tet1-asc	5'-TCATCATCATCACGTGGGCGCGCCAATGGTGCAGGT TGTTCTCAATG-3'
Tet2-lin	5'-AGGATCAATTTTGAACCTCTCTCCC-3'
yttA1-tet	5'-GGGAGAGAGTTCAAAATTGATCCTGAAGGTCATT AAATCGTCGTTGTG-3'
yttA2	5'-AGAAGATGCAAAAACGGCAAAGG-3'
spec-asc	5'-TGGCGCGCCGATTTTCGTTCTGTGAATACATG-3'
spec-bst	5'-ACAGGTTACCACCAATTAGAATGAATATTTCCC-3'
bceABBs-pml	5'-GTGATTTTAGAAGCGAATAAAATTCTG-3'
bceABBs-asc	5'-TTGGCGCGCCAGGAAGCAGAAACGGCATCTACC-3'
ytsCDB1-pml	5'-ATGATTTTAGAAGCGAAAAAATACG-3'
ytsCDB1-pml	5'-TTGGCGCGCCGTCGATGGGCTTTTGATTATGC-3'
bceAB Bh-pml	5'-GCAATACTTGAAGCGACAAACATTC-3'
bceAB Bh-asc	5'-TTGGCGCGCCTTTAAGTGAAGAGCAGCGGCAAC-3'
loop1/FseBbv	5'-GCTGAGGACAATGAGGCCGCGGAGTAATACGA GATGTAAGCAAG-3'
loop2/FseBbv	5'-GCCGGCCTCATTGTCCTCAGCTCACTGTTTGGTAT GGTGATGTTC-3'
loop-BceBBs_fse	5'-TCGGCCGGCCTTTTCGGAAAAGACCGCTGAACAAAAT G-3'
loop-BceBBs_bbv	5'-GAGCTGAGGACTTTTTGCGCAGCGCTTGTATCTAG-3'
loop-ytsD-B1_fse	5'-TCGGCCGGCCTTGCAGAGAAAACCGCCGAACAAAAC-3'
loop-ytsD-B1_bbv	5'-GAGCTGAGGACTTTTTGAGCTGTGCTTGCATCAAG-3'
loop-BceBBh_fse	5'-TCGGCCGGCCTTGCAGAAAAAACAGCGGAACATTATG-3'
loop-BceBBh_bbv	5'-GAGCTGAGGACCTTCTGACTTTGGCTCATTTCAAC-3'
vraFG_PmlI	5'-CACAAGAAGTGTTCGAGATATC-3'
vraFG_AscI	5'-TTGGCGCGCCGCTTCCAGTATAGTTCGTGAATCC-3'
vraDE_PmlI	5'-ACGATATTATCAGTGCAACATGTTTC-3'
vraDE_AscI	5'-TTGGCGCGCCGCAATGACGTTATACCAAGTTACAGTC-3'

Table S4: Liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

C) Conclusion Article

Le but de cette étude était d'une part d'étudier la conservation des systèmes phosphorelais possédant un senseur de type Intra Membrane-Histidine Kinase (IM-HK) et des transporteurs ABC possédant une MSD à boucle extracytoplasmique longue et d'autre part, de mieux comprendre le fonctionnement de ce type de système en étudiant plus particulièrement la mécanistique du système BceRSAB, conférant la résistance à la bacitracine chez *B. subtilis*, ainsi que le rôle de la boucle de BceB.

1) Les modules de détection/résistance aux antibiotiques

L'analyse phylogénomique réalisée pendant ce travail porte sur plus de 800 génomes et nous a permis de répertorier les modules phosphorelais/transporteurs ABC possédant les caractéristiques suivantes : le senseur ou histidine kinase est de type IM-HK et possède deux fragments transmembranaires encadrant une très courte boucle extracytoplasmique (inférieure ou égale à 12 résidus) et la MSD possède 10 fragments transmembranaires, dont les fragments 7 et 8 sont séparés par une très large boucle extracytoplasmique de plus de 170 résidus. Cette analyse plus exhaustive que celle que nous avons réalisée précédemment (Joseph et al., 2002) confirme que de tels modules (phosphorelais/transporteurs ABC) sont restreints aux Firmicutes, groupe dans lequel ils sont apparus et se sont largement répandus. Les quatre gènes codant pour les éléments composant ces modules (histidine kinase, régulateur de réponse, NBD et MSD) ont coévolué depuis leur émergence dans ce phylum. L'histoire évolutive de ces modules est hautement dynamique. En effet, il a été mis en évidence de nombreux transferts horizontaux, des événements de duplications ou de perte de gènes, ce qui a conduit à un répertoire très varié de ces modules au sein des Firmicutes. D'autre part, les gènes codant pour les quatre partenaires sont restés groupés au niveau chromosomique durant l'évolution. Une analyse phylogénétique fine de chacun des membres de ces modules a été réalisée et a permis de proposer une classification en six sous-familles. Récemment, un autre groupe a réalisé une étude très similaire et a obtenu des résultats en parfaite concordance avec les nôtres (Dintner et al., 2011). Leur classification fait apparaître, pour les transporteurs ABC, huit groupes phylogénétiques correspondant en fait aux groupes I, II, IV, V et VI que nous avons décrits, le groupe III ayant été scindé en trois groupes distincts (III, VII et VIII).

Dans notre classification, la sous-famille IV contient le transporteur BceAB de *B. subtilis* conférant la résistance à la bacitracine, ainsi que les transporteurs YtsCD de *B. licheniformis* et *B. halodurans* et VraDE de *S. aureus*, impliqués dans la résistance à ce même antibiotique (ce travail,(Pietäinen et al., 2009)).

2) Les ABC transporteurs de la sous-famille IV et leur rôle fonctionnel

Afin de mieux appréhender le rôle du transporteur BceAB dans la régulation du système BceRSAB, nous nous sommes intéressés à des systèmes orthologues de la même famille, impliqués ou potentiellement impliqués dans la résistance à la bacitracine, à savoir, BceAB de *B. halodurans*, YtsCD de *B. licheniformis*, ainsi que le transporteur VraDE de *S. aureus*. Nous avons alors voulu savoir si chacun de ces transporteurs étaient capables, d'une part, d'assister le système de transmission du signal BceRS de *B. subtilis* en réponse à la bacitracine et d'autre part, de conférer la résistance à la bacitracine à *B. subtilis*. Dans des conditions de surproduction du régulateur de réponse BceR, qui permettent de s'affranchir de la présence de bacitracine pour l'activation du promoteur *PbceA*, nous avons pu montrer pour la première fois que BceAB de *B. halodurans* et YtsCD de *B. licheniformis* confèrent tous deux la résistance à la bacitracine chez *B. subtilis* et sont donc très probablement impliqués dans cette résistance dans leur hôte d'origine. Par contre VraDE qui confère la résistance à la bacitracine chez *S. aureus*, probablement à cause d'un problème de contexte de paroi bactérienne différente n'est pas capable d'assurer la protection de *B. subtilis* à l'antibiotique.

D'autre part, nos résultats montrent clairement que seul le transporteur le plus proche phylogénétiquement (YtsCD de *B. licheniformis*) est capable de participer à l'activation du promoteur *bceA*. Le transporteur BceAB de *B. halodurans* ne permet qu'une activation très faible du système, tandis que VraDE en est incapable. Ceci suggère que le mécanisme d'activation pourrait faire intervenir une interaction entre l'un des composants de l'ABC transporteur et l'histidine kinase BceS. Le transporteur ABC pourrait alors constituer le premier senseur de la présence de bacitracine qui activerait par la suite l'histidine kinase. Cette hypothèse est en partie reprise par Dintner et collaborateurs qui proposent que le senseur ne pourrait percevoir directement un stimulus, mais transférerait l'information provenant du transporteur ABC associé vers le régulateur de réponse (Dintner et al., 2011).

Ce mode de fonctionnement ne semble pas unique au module BceRSAB de *B. subtilis*, puisque le transporteur ABC BceAB (anciennement MbrCD) de *S. mutans* est indispensable à la transmission du signal dans la réponse du module MbrABCD de *S. mutans* à la bacitracine. De même, la régulation par la vancomycine du transporteur VraFG de *S. aureus* semble requérir la perméase VraG. Il a également été montré au laboratoire que le transporteur PsdAB de *B. subtilis*, appartenant à la sous-famille III, a le même mode de fonctionnement. En effet, en présence d'enduracine, une souche délétée des gènes codant pour ce transporteur est incapable d'activer le promoteur de *psdA* et donc de participer à l'induction du système. Finalement, Hiron et collaborateurs (Hiron et al., 2011) ont montré que chez *S. aureus*, le transporteur BraDE, appartenant à la sous-famille II, est indispensable au bon fonctionnement du module BraRSD en réponse à la bacitracine et à la nisine.

Ce système présente une particularité très intéressante puisque la résistance à ces deux antibiotiques fait intervenir chez *S. aureus* un troisième partenaire, VraDE (isolé dans la sous-famille IV) qui est le transporteur ABC conférant la résistance,

BraDE ne constituant que le senseur primaire des antibiotiques (Hiron et al., 2011). De façon intéressante, notons que le transporteur VraDE n'est associé à aucun phosphorelais dans la sous-famille IV.

Ces modules de détection/résistance qu'ils soient simples (un phosphorelais associé à un transporteur ABC) ou faisant intervenir trois partenaires (un phosphorelais et deux transporteurs ABC) constituent un nouveau mécanisme de régulation très original. La conservation de ces modules au sein des Firmicutes, nous a amené à postuler qu'ils ont tous le même mode de fonctionnement et qu'ils sont impliqués dans des mécanismes de résistance à des antibiotiques peptidiques.

3) La boucle extracytoplasmique de la MSD du ABC transporteur : ses caractéristiques et son rôle fonctionnel.

La fonction de la boucle extracytoplasmique du translocateur a été abordée en utilisant une approche de délétion/réintégration de cette boucle dans BceB de *B. subtilis*. Les résultats obtenus montrent qu'en présence de bacitracine, la boucle de BceB est indispensable, tant pour l'activation du promoteur du gène *bceA*, donc de la régulation du système, que pour la résistance de la bactérie à l'antibiotique. Un résultat identique est obtenu avec le

transporteur YtsCD de *B. licheniformis* qui, lorsqu'il est délété de sa boucle, devient lui aussi incapable de participer à l'activation du promoteur de *bceA* en présence de bacitracine chez *B. subtilis* et

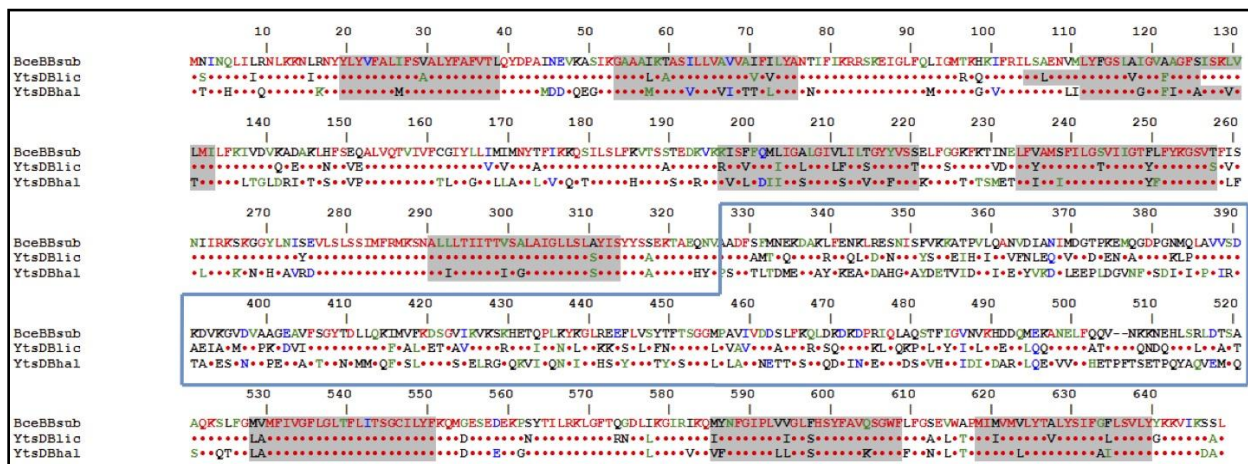


Fig. 38 : Alignement de la séquence de BceB de *B. subtilis* (Bsub) avec celle de deux des orthologues : YtsD de *B. licheniformis* (Blic) et YtsD de *B. halodurans* (Bhal).
 Les points rouges représentent les résidus identiques.
 Les zones grises correspondent aux positions approximatives des segments transmembranaires.
 La zone encadrée correspond à la boucle extracytoplasmique de BceB.

donc de conférer la résistance à cet antibiotique. Nous avons voulu ensuite tester l'interchangeabilité des boucles de perméases. Au sein de la famille IV, quatre des transporteurs étant impliqués dans la résistance à la bacitracine, nous avons changé la boucle de BceB de *B. subtilis* par la boucle de ces quatre transporteurs. Seule la boucle de YtsD de *B. licheniformis* est capable de restaurer, bien que très partiellement, la capacité du transporteur BceAB à participer à l'activation du promoteur *bceA* en présence de bacitracine chez *B. subtilis*. Cependant, ce transporteur hybride n'est pas capable de protéger la bactérie de l'action de la bacitracine. Comme pour les transporteurs entiers et leur capacité à remplacer fonctionnellement BceAB de *B. subtilis*, on retrouve encore la notion de proximité phylogénétique puisque seule la boucle du translocateur la plus proche de BceB de *B. subtilis* est capable, bien que très partiellement, de remplacer la boucle originelle. Cependant, une comparaison des séquences des boucles des trois transporteurs ABC les plus proches (BceB de *B. subtilis*, YtsD de *B. licheniformis* et BceB de *B. halodurans*, Fig.38) indique que ce domaine est le moins conservé de la MSD, ce qui pourrait expliquer nos résultats. Dans ce contexte, il est difficile d'attribuer un rôle direct de reconnaissance de l'allocrite par la boucle puisque les trois MSD décrites ci-dessus font partie de transporteurs ayant la même spécificité (bacitracine). Ce résultat est en contradiction avec les données récentes publiées par Hiron et collaborateurs (Hiron et al., 2011) qui ont obtenu un changement de spécificité de VraFG (vancomycine pour bacitracine) en substituant la boucle de VraG par celle de VraE. L'environnement immédiat du transporteur (composition du peptidoglycane, protéines accessoires) pourrait expliquer cette divergence. En effet, le travail de Hiron et collaborateurs (Hiron et al., 2011) a été réalisé chez *S. aureus* avec des protéines de *S. aureus*, alors que nous avons utilisé des protéines hétérologues, donc hors de leur contexte naturel, chez *B. subtilis*. La fonction de la boucle extracytoplasmique de la MSD est donc très importante, ce qui se situe à un niveau de l'activation et donc de la régulation du module ou à un niveau de la résistance à l'antibiotique. Une généralisation, plus formelle, de l'importance fonctionnelle de la boucle aux autres modules phosphorelais/transporteur ABC reste cependant à faire.

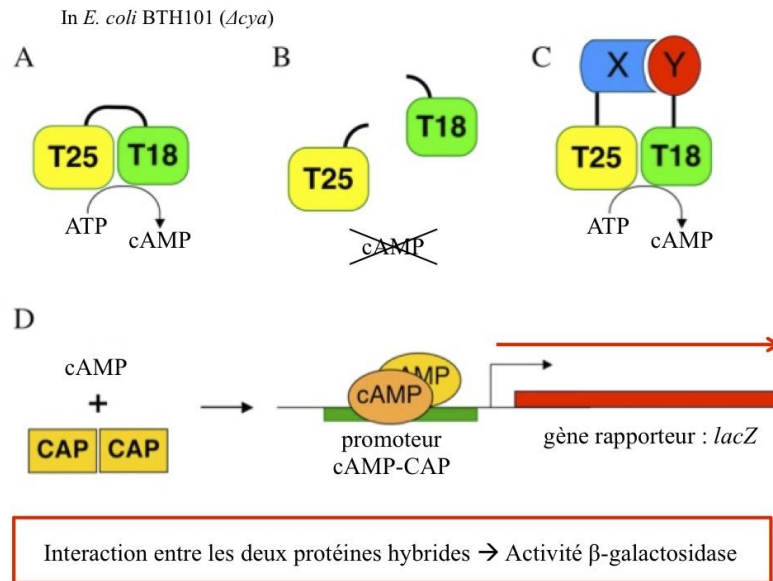


Fig.39 : Principe du double hybride bactérien.

Ce système est basé sur la reconstitution de l'activité adénylate cyclase chez *E. coli*. Il exploite le fait que le domaine catalytique de l'adénylate cyclase (CyaA) de *Bordetella pertussis* est composé de deux fragments complémentaires, T25 et T18 (A). Ces deux domaines ne peuvent être actifs si ils sont séparés physiquement (B). Lorsque ces deux fragments sont fusionnés à deux protéines d'intérêt, X et Y, l'interaction de ces protéines hybrides permet la reconstitution du domaine catalytique de l'adénylate cyclase et donc la synthèse d'AMP cyclique (cAMP) (C). L'AMP cyclique peut alors interagir avec la protéine CAP (Catabolite Activator Protein). Ce complexe va activer l'expression de différents gènes, dont le gène rapporteur *lacZ*, impliqué dans le catabolisme du lactose (D). La bactérie est alors capable d'utiliser le lactose et est ainsi facilement reconnaissable sur un milieu approprié.

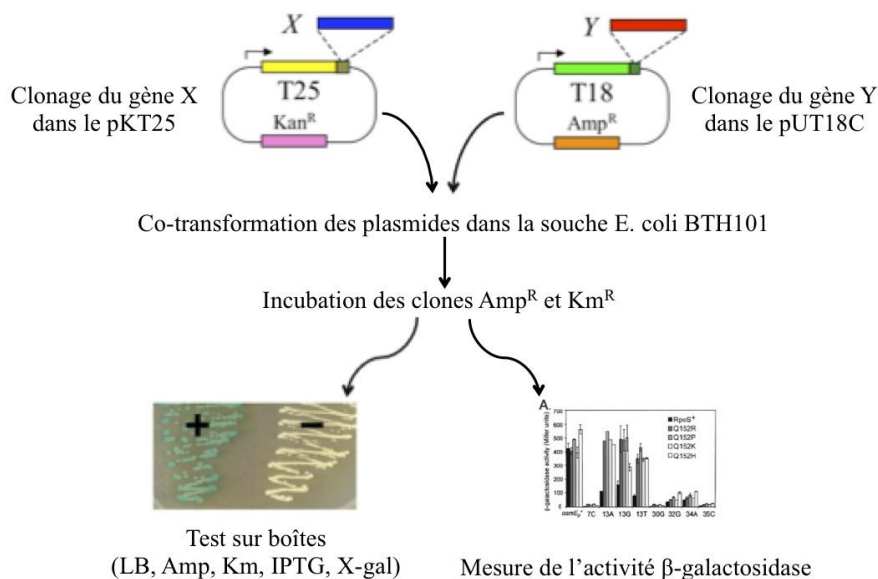


Fig.40 : Méthodologie utilisée lors de l'analyse des interactions protéine-protéine par double hybride bactérien.

II) Interaction entre le senseur BceS et le transporteur ABC BceAB

L'échange de transporteurs ABC au sein de la sous-famille IV a suggéré que le mécanisme d'activation des modules phosphorelais/transporteur ABC pourrait faire intervenir une interaction entre l'un des composants de l'ABC transporteur et l'histidine kinase BceS. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé deux approches permettant de la mise en évidence d'interactions entre protéines : le double hybride bactérien d'une part et la co-immunoprécipitation d'autre part.

A) Résultats

1) Double hybride

Nous avons travaillé avec le système développé par le groupe du Docteur Lavant à l'institut Pasteur (Karimova et al., 1998) et distribué par Euromedex®. Ce système utilise la souche *E.coli* BTH101, déficiente pour l'adénylate cyclase (Cya). Elle possède un gène rapporteur *lacZ* (codant pour la β -galactosidase), induit par l'AMPc. Les fragments d'ADN codant pour les protéines d'intérêts sont clonés dans les deux vecteurs, pUT18 (Amp^R) et pKT25 (Km^R) qui portent chacun un domaine différent (T18 et T25) du gène codant pour l'enzyme adénylate cyclase de *Bordetella pertusis*. Si les deux protéines analysées sont capables d'interagir entre elles, elles assurent alors le rapprochement des deux sous-unités (T18 et T25) de l'adénylate cyclase restaurant ainsi son activité de production d'AMP cyclique (AMPc) permettant l'activation du gène *lacZ* par la protéine CAP (Fig.39).

Nous avons testé toutes les combinaisons des interactions possibles entre les trois partenaires, l'histidine kinase BceS et les deux domaines du transporteur ABC, le domaine NBD BceA et la MSD BceB. Nous avons donc cloné les gènes *bceS*, *bceA* et *bceB* dans les deux vecteurs pUT18C (Amp^R) et pKT25 (Km^R) qui portent chacun un domaine différent (T18 et T25) du gène codant pour l'enzyme adénylate cyclase de *Bordetella pertusis* (Fig.40). Ainsi, les gènes clonés se trouvent en aval du fragment codant pour le T25 ou du fragment codant pour le T18 et forment une fusion traductionnelle avec ces domaines. Ces fusions sont placées sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Nous avons ensuite

co-transformé ces différents plasmides en utilisant les neuf combinaisons possibles pour tester les

N°	Co-transformation	Utilisation
1	pUT18C / pKT25	Témoin négatif
2	pUT18C Zip / pKT25 Zip	Témoin positif
3	pUT18C <i>bceS</i> / pKT25 <i>bceS</i>	Test interaction BceS/BceS
4	pUT18C <i>bceS</i> / pKT25 <i>bceA</i>	Test interaction BceS/BceA
5	pUT18C <i>bceS</i> / pKT25 <i>bceB</i>	Test interaction BceS/BceB
6	pUT18C <i>bceA</i> / pKT25 <i>bceS</i>	Test interaction BceA/BceS
7	pUT18C <i>bceA</i> / pKT25 <i>bceA</i>	Test interaction BceA/BceA
8	pUT18C <i>bceA</i> / pKT25 <i>bceB</i>	Test interaction BceA/BceB : témoin positif interne
9	pUT18C <i>bceB</i> / pKT25 <i>bceS</i>	Test interaction BceB/BceS
10	pUT18C <i>bceB</i> / pKT25 <i>bceA</i>	Test interaction BceB/BceA : témoin positif interne
11	pUT18C <i>bceB</i> / pKT25 <i>bceB</i>	Test interaction BceB/BceB
12	pUT18C <i>bceS</i> / pKT25	Témoin négatif
13	pUT18C <i>bceA</i> / pKT25	Témoin négatif
14	pUT18C <i>bceB</i> / pKT25	Témoin négatif
15	pUT18C / pKT25 <i>bceS</i>	Témoin négatif
16	pUT18C / pKT25 <i>bceA</i>	Témoin négatif
17	pUT18C / pKT25 <i>bceB</i>	Témoin négatif

Tableau 1 : Liste des co-transformations réalisées

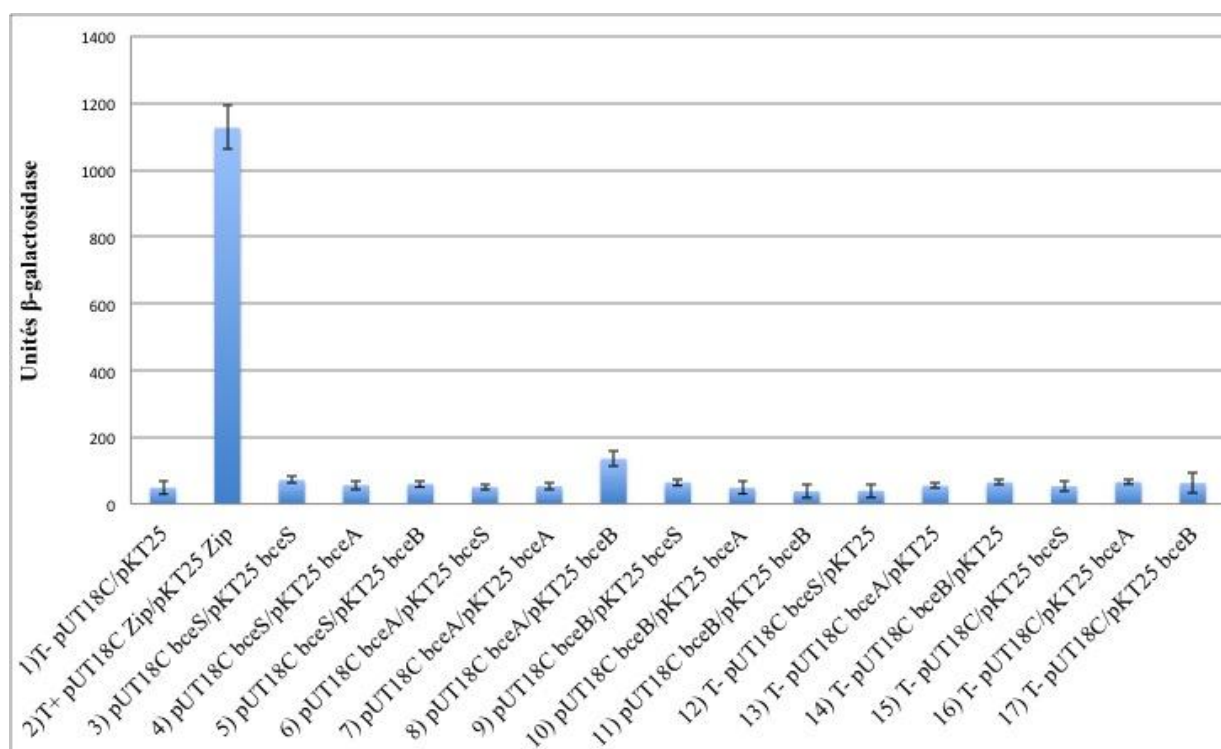


Fig. 41: Mesure des activités β-galactosidase des co-transformants dans trois expériences différentes (valeur moyenne ± écart-type).

interactions dans les deux sens (tableau 1). Ainsi, en plus du contrôle positif fourni dans le kit, nous disposons de contrôles internes avec une interaction forte déjà mise en évidence dans d'autre cas, celle des deux sous unités du transporteur ABC (Liu and Ames, 1998), mais également celles entre deux monomères de BceA et deux monomères de BceB, puisqu'il a été montré que ces deux sous unités agissent sous forme dimérique. Les tests des interactions utilisant un vecteur contenant l'un des gènes d'intérêt avec l'autre vecteur vide correspondent à des témoins négatifs. L'ensemble des tests effectués est résumé dans le tableau 1.

La mesure de l'activité enzymatique en milieu liquide indique une très forte activité pour le témoin positif (1100 unités β -galactosidase), tandis que les différents témoins négatifs présentent une très faible activité, démontrant ainsi le caractère parfaitement fonctionnel de l'approche expérimentale (Fig.41). La plupart des activités β -galactosidas mesurées pour les interactions testées ne sont pas significativement différentes de celles correspondant aux témoins négatifs. Seule l'interaction entre BceA et BceB, et ce uniquement dans un sens : put18C *bceA* / pkt25 *bceB* (n°8, Fig.41), est très légèrement positive alors que les protéines correspondantes constituent un témoin interne à l'expérience.

Des tests en milieu solide ont également été réalisés, et ceci en présence ou en absence de bacitracine (200 μ g/ml), afin de voir l'influence de l'inducteur du système BceRSAB. Les boîtes ont été placées à 30°C, puis photographiées après 24 heures et 48 heures d'incubation.

Comme l'indiquent les résultats (Fig.42), accumulant le produit de la réaction sur un temps long, il semble que cette approche soit plus sensible que la mesure d'activité en milieu liquide. En effet, après 24 heures d'incubation, aussi bien avec que sans bacitracine, en plus du témoin positif (pUT18C Zip / pKT25 Zip, (2)), les souches correspondant à la co-transformation pUT18C *bceS* / pKT25 *bceS* (3) et pUT18C *bceA* / pKT25 *bceB* (8) commencent à bleuir. De plus, en présence de bacitracine, la souche correspondant à la co-transformation pUT18C *bceS* / pKT25 *bceB* (5) semble légèrement plus bleue. Le bruit de fond augmentant considérablement, il est très difficile de mettre en évidence d'autres interactions à 48 heures d'incubation.

Ces résultats, bien que peu significatifs, vont dans le sens de notre hypothèse. En effet en milieu solide, une interaction très faible entre BceS et BceB, seulement dans un sens et une

interaction peu significative entre BceS et BceA semble être mise en évidence. Il est à noter que des interactions connues comme la formation de dimères de BceA ou de dimères de BceB

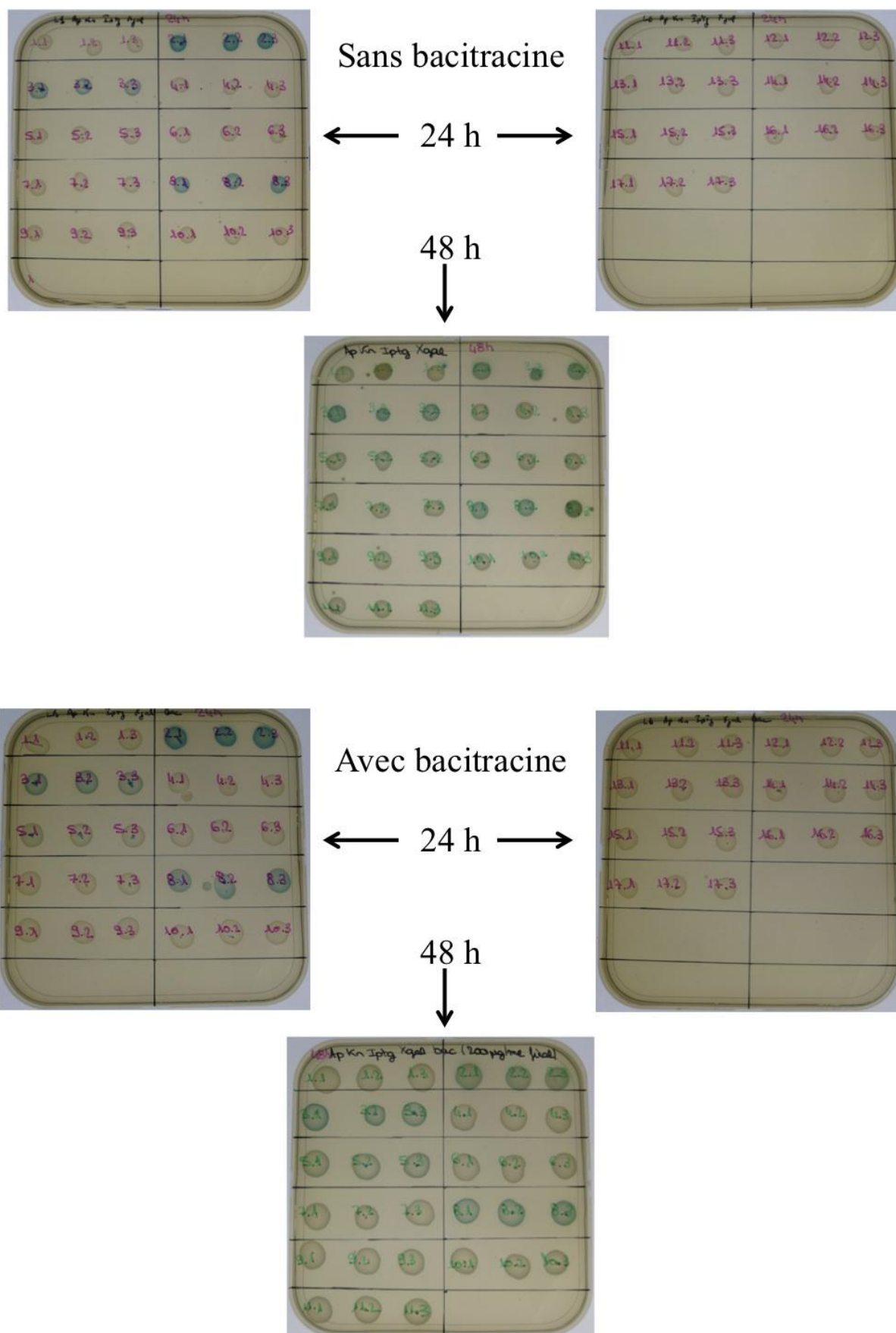


Fig.42 : Photos des tests sur boîtes, avec ou sans bacitracine, 24 heures ou 48 heures après ensemencement.

ne sont pas détectées et que d'autre part l'interaction entre BceA et BceB n'est que faiblement détectée, que ce soit par mesure d'activité en milieu liquide ou détection d'activité sur boîte, alors qu'il a déjà été montré que l'interaction entre NBD et MSD est forte (Liu and Ames, 1998). Dans le cas particulier que nous avons étudié, il semble que la sensibilité de l'approche du double hybride bactérien ne soit pas suffisante pour détecter les interactions que nous voulions mettre en évidence. Bien que cette technique ait déjà été utilisée pour détecter des interactions entre protéines membranaires (Karimova et al., 2005), l'utilisation de protéine intrinsèque de la membrane telle que la MSD BceB qui possède dix fragments transmembranaires ou du domaine NBD BceA qui est susceptible d'interagir avec d'autres perméases de la bactérie hôte et avoir ainsi un comportement similaire à la perméase, pourrait poser des problèmes. Peut-être, faudrait-il réaliser ces expériences en utilisant des fragments solubles des protéines.

2) Co-immunoprécipitation BceS

La co-immunoprécipitation est largement utilisée dans l'étude des interactions protéiques, car elle peut être réalisée sur des protéines endogènes, marquées avec une étiquette (« tag ») et surexprimées. A partir d'un lysat cellulaire traité ou non, la protéine d'intérêt est immunoprécipitée avec un anticorps spécifique lié à des billes de protéine A ou G couplées à des billes de sépharose. Les conditions étant non dénaturantes, toutes les protéines interagissant avec la protéine d'intérêt vont être aussi immunoprécipitées. Après lavages, les complexes protéiques sont dénaturés et les partenaires d'interaction sont analysés sur gel dénaturant (SDS-PAGE) suivi d'une détection par western blot, à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines cibles supposées. Cette méthode permet de détecter à la fois les interactions directes et indirectes.

Dans notre cas, nous avons construit des chimères protéiques entre BceS et la glutathione S-transférase (GST) utilisée comme étiquette. Pour cela, nous avons utilisé le vecteur, pNG214, développé pour des expériences de « Tap-Tag » chez *B. subtilis* (Yang et al., 2008). Le gène d'intérêt a été inséré dans ce plasmide via les sites enzymatiques *XhoI* et *EcoRI*. Le plasmide ainsi obtenu a été utilisé pour transformer une souche de *B. subtilis* sauvage. Les recombinants correspondant à un simple événement de recombinaison ont été sélectionnés sur chloramphénicol. La souche recombinante, appelée *Bs-bceS::GST*, possède

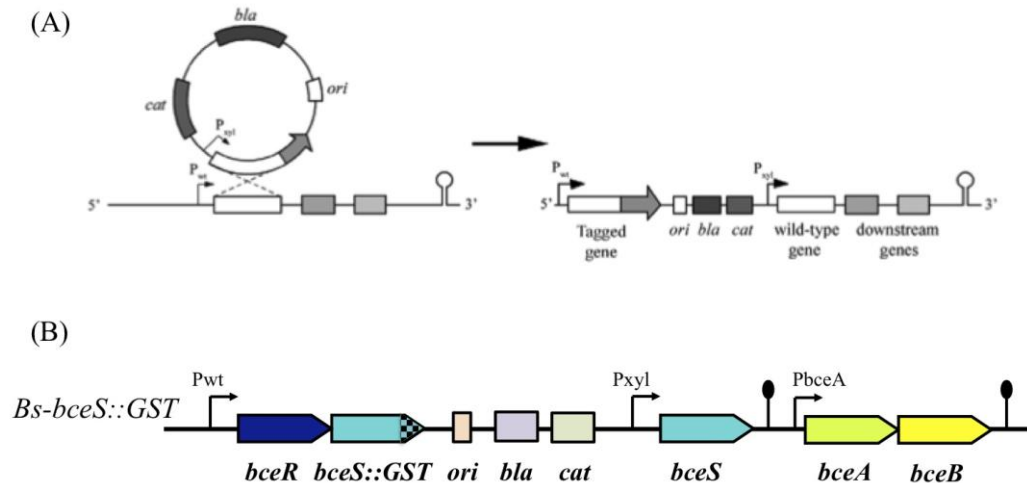


Fig.43 : Construction de la souche *Bs-bceS::GST*

(A) Intégration du vecteur pNG218 sur le chromosome de *B. subtilis*. Le vecteur s'intègre entièrement dans l'ADN génomique par un événement de recombinaison homologue, créant ainsi une fusion traductionnelle entre le gène d'intérêt et la séquence codant pour l'étiquette GST, sous le contrôle du promoteur sauvage. Les gènes situés en aval sont sous le contrôle d'un promoteur inductible par le xylose.

(B) Représentation schématique du locus codant pour le système BceRSAB chez la souche *Bs-bceS::GST*. Le gène *bceS::GST* est sous le contrôle du promoteur sauvage, tandis que le gène *bceS* sauvage est sous le contrôle d'un promoteur inductible par le xylose.

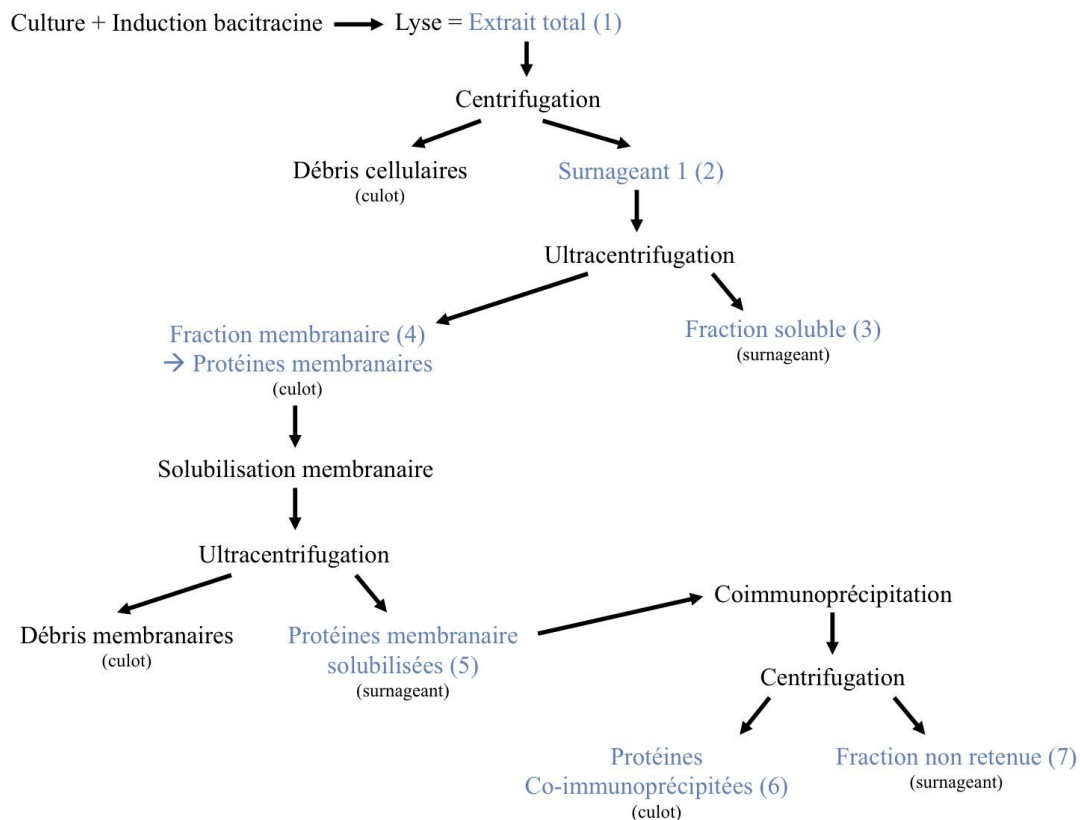


Fig.44 : Méthodologie utilisée lors de la co-immunoprécipitation de BceS.

donc un senseur BceS étiqueté avec un tag GST et cette construction est présentée au locus et donc sous le contrôle du promoteur d'origine de *bceS* (Fig.43).

Nous avons ensuite comparé le niveau de résistance à la bacitracine de la souche *Bs-bceS::GST* à celui de la souche sauvage en réalisant des mesures d'IC₅₀ (concentration de bacitracine inhibant la croissance cellulaire à 50%). L'IC₅₀ de la souche sauvage est de l'ordre de 0,4 mg/ml et celle de la souche *Bs-bceS::GST* est du même ordre de grandeur (0,35 mg/ml) montrant ainsi que BceS étiqueté est fonctionnel.

Selon notre hypothèse, l'interaction entre le senseur BceS et une des sous-unités du transporteur ABC, BceAB, aurait lieu en présence de bacitracine et cette interaction pourrait être transitoire. De plus, il avait été observé au laboratoire qu'en absence de bacitracine, le niveau de transcrits de chacun des gènes du système BceRSAB était relativement bas et qu'aucune variation de ce niveau n'était détectée tout au long de la croissance de *B. subtilis* (Joseph et al., 2002). En présence de bacitracine, le niveau de transcrits des gènes *bceS* et *bceR* n'augmente pas. *bceS* est donc toujours exprimé à un niveau basal et ainsi, la protéine BceS pourrait être difficilement détectable par un Western Blot.

Pour optimiser l'expérience de co-immunoprécipitation, nous avons utilisé un grand volume de milieu (2,5L) et cultivé la souche, *Bs-bceS::GST* jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,6 ou 0,8. A ce stade, la bacitracine a été ajoutée dans la culture pendant 30 minutes, ce qui permet une induction optimale du système (Bernard et al., 2007). La souche *Bs-bceS::GST*, ainsi cultivée, a ensuite été lysée à la presse de French, puis un fractionnement cellulaire a été réalisé (Fig.44), afin de récupérer la fraction membranaire où sont localisés le senseur BceS-GST et le transporteur ABC, BceAB. Les protéines membranaires ont ensuite été solubilisées avec du CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate), un détergent non dénaturant. Le senseur BceS-GST a ensuite été co-immunoprécipité avec ses interactants potentiels grâce à des anticorps anti-GST couplés à des billes de sépharose. Des Western Blot ont ensuite été réalisés avec les anticorps anti-GST, anti-BceA et des anticorps dirigés contre la boucle extracytoplasmique de BceB. Pour chaque expérience les fractions protéiques correspondant à chaque étape de l'expérience ont été chargées (Fig.45).

La figure 45 indique qu'aucune interaction, que ce soit entre BceS et BceA, ou entre BceS et BceB n'a pu être mise en évidence. Cependant, le déroulement de l'expérience semble correct jusqu'à l'étape de co-immunoprécipitation. En effet, on peut visualiser,

sur chaque membrane, le signal correspondant à chaque protéine jusqu'à cette étape. Ensuite, les signaux sont

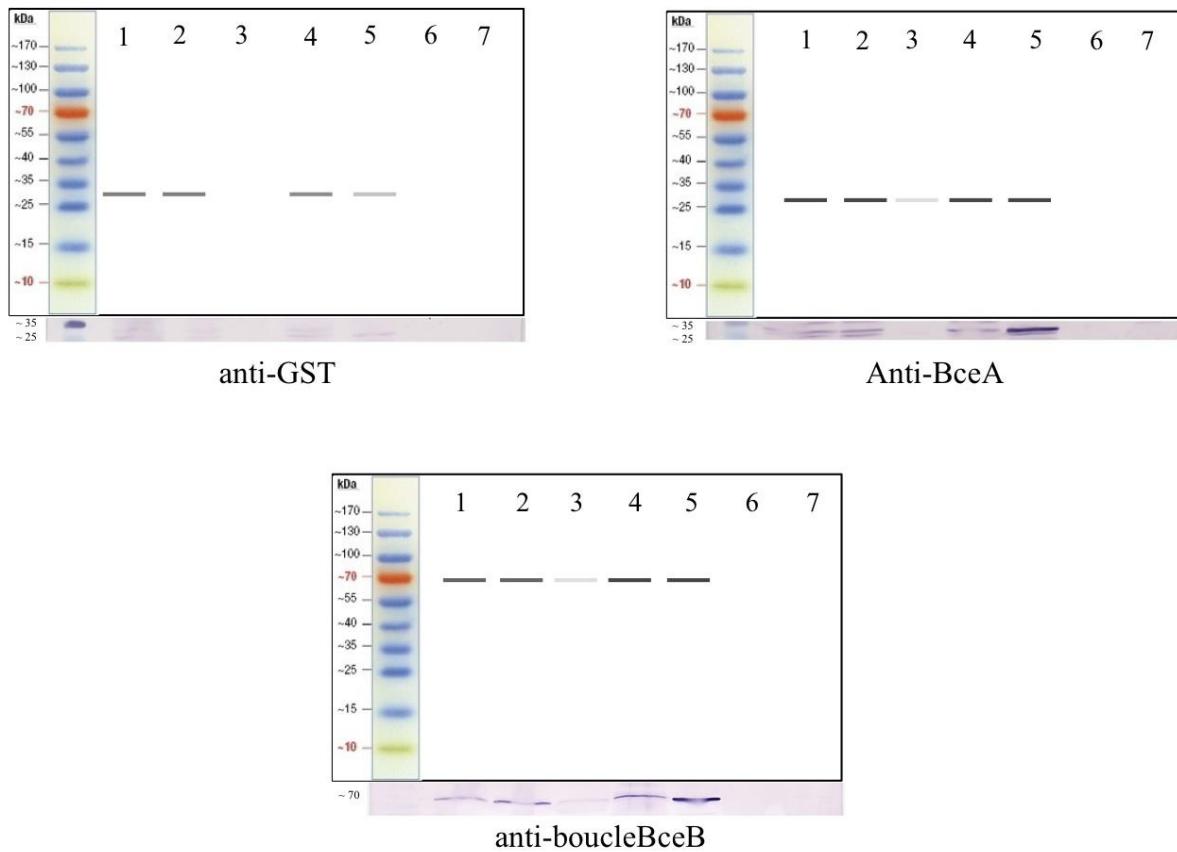


Fig.45 : Membranes obtenues après les Western blot anti-GST, anti-BceA, anti-boucleBceB, réalisés avec les différentes fractions provenant de l'expérience de coimmunoprécipitation de BceS.

- 1 : Extrait total
- 2 : Surnageant 1
- 3 : Fraction soluble
- 4 : Fraction membranaire
- 5 : Fraction membranaire solubilisée
- 6 : Protéines Co-immunoprécipitées
- 7 : Fraction non retenue

Nota : les blots obtenus sont présentés en dessous d'une figure schématisant les résultats obtenus.

perdu, même sur la membrane correspondant au Western Blot anti-GST, alors que la protéine BceS-GST devrait toujours être présente. Nous pensons que la quantité de protéine BceS-GST n'était pas suffisamment importante pour réaliser cette expérience. En effet, on peut voir qu'après la lyse cellulaire, cette protéine étiquetée est présente en faible quantité, et que cette dernière diminue à chaque étape ultérieure de l'expérience. Juste avant l'étape de co-immunoprécipitation, elle n'est quasiment plus détectable par Western Blot. Ainsi, il semble que nous ayons atteint les limites de sensibilité de la méthode. Bien que conscient de s'éloigner des conditions physiologiques, nous aimerions aborder cette expérience dans des conditions de surexpression du senseur étiqueté (BceS-GST), de sorte que ce dernier soit produit en quantité plus importante, permettant ainsi d'aborder la co-immunoprécipitation dans de meilleures conditions.

Les deux approches d'interaction protéine-protéine, que nous avons utilisées, ne nous permettent pas de conclure quant à notre hypothèse de départ.

Les méthodes utilisées ne semblent pas assez sensibles pour répondre à la question posée.

Nous n'écarterons donc pas l'hypothèse d'une interaction entre le senseur BceS et le transporteur ABC, BceAB. Nous comptons dans un premier temps recommencer l'expérience de co-immunoprécipitation de BceS avec le senseur. Puis, dans un deuxième temps, utiliser d'autres méthodes d'interaction protéine-protéine, comme des techniques de détection des interactions par fluorescence ou bioluminescence (FRET ou BiFC) ou d'autres méthodes biochimiques, comme le « pull-down » ou le « Tap-Tag ».

B) Matériels et Méthodes

1) Souches bactériennes, plasmides et conditions de croissance

Conditions de croissance et de culture

Les bactéries sont cultivées en milieu riche Luria-Bertani (LB) sous agitation ou en milieu solide (LB contenant 14g/L d'agar) à 37°C ou 30°C comme indiqué. Les antibiotiques sont fournis par Sigma Aldrich et ajoutés aux milieux quand nécessaire : chloramphénicol (50 µg/mL) pour *B. subtilis* et ampicilline (100µg/mL) et kanamycine (50µg/mL), pour *E. coli*. La bacitracine a été utilisée aux concentrations indiquées.

Transformation d'*E. coli* DH5α

Les bactéries *E. coli* DH5α sont rendues compétentes et transformées avec l'ADN d'intérêt (Harwood and Cutting, 1990). Une fois transformées et sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline (100µg/ml) (pUT18C) ou de la kanamycine (50 µg/ml) (pKT25), la vérification de l'insertion du matériel génétique est réalisée par PCR sur colonies grâce à la GoTaq de Promega.

Co-transformation d'*E. coli* BTH101

Les bactéries *E. coli* BTH101 sont rendues compétentes et transformées avec les deux types de plasmides pUT18C et pKT25, contenant ou non les gènes d'intérêt (Harwood and Cutting, 1990). Une fois transformées, elles sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline (100µg/ml) (pUT18C) et de la kanamycine (50 µg/ml) (pKT25). Les boîtes sont placées à 30°C, pendant 48 heures.

Transformation de *B. subtilis*

Les bactéries *B. subtilis* sont rendues compétentes et transformées avec l'ADN d'intérêt (Kunst and Rapoport, 1995) purifié grâce aux kits de préparation de plasmides Mini de Promega ou Midi de Qiagen. La vérification de l'insertion du matériel génétique est réalisée par PCR (GoTaq, Promega) sur l'ADN génomique extrait des clones *via* le kit QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen.

Test Double hybride sur boîte

Les transformants sont cultivés en milieu LB contenant de l'IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 1mM, qui va induire l'expression des gènes clonés sur les vecteurs pUT18C et pKT25, de l'ampicilline (100 μ g/ml) et de la kanamycine, pendant une nuit, à 30°C. Puis, les cellules sont étalées sur des boîtes contenant du LB, du X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside, 40 μ g/ml), de l'IPTG, de l'ampicilline et de la kanamycine. Une coloration bleue des clones est alors obtenue sur ce milieu en cas d'interaction et donc d'expression du gène *lacZ*. Les vecteurs pUT18 et pKT25, n'exprimant que les fragments T18 et T25, servent de témoins négatifs. Les vecteurs pKT25-Zip et pUT18-Zip sont utilisés comme témoins positifs d'interaction. Ils dérivent des vecteurs pUT18 et pKT25 et produisent les domaines T18 et T25 fusionnés à un motif Leucine Zipper (protéine GCN4 de la levure). Les boîtes sont incubées à 30°C et peuvent y rester jusqu'à 72 heures.

Mesure de l'IC50 pour la bacitracine

Une série de dilution en cascade (de deux en deux) de la bacitracine dans du LB est réalisée en microplaque de titration dans un volume final de 100 μ L de façon à disposer d'une gamme décroissante de concentration d'antibiotique partant de 1 mg/mL. Chaque point est réalisé en « tétraplicat » et un témoin sans antibiotique est ajouté. 100 μ L de cellules à tester ($DO_{600}=0,3$) sont alors rajoutés dans chaque puit. La plaque est incubée pendant 5 heures sous agitation à 37°C. La mesure de la DO_{600} réalisée avec un lecteur de plaque Tecan (Sunrise) permet de quantifier la croissance cellulaire et d'en déduire le pourcentage de croissance ($100 \times$ rapport de DO de l'essai sur DO du témoin sans antibiotique). Le tracé de la courbe du pourcentage de croissance en fonction de la concentration d'antibiotique permet de déduire l'IC50 de la souche testée qui correspond à la concentration de bacitracine inhibant 50% de la croissance cellulaire.

2) Techniques de biologie moléculaire et biochimie

Amplification, purification et extraction d'ADN

L'amplification des différents gènes, utilisés pendant ce travail, a été faite en utilisant le kit Prime Star Polymerase (Takara). Le programme PCR utilisé comprend les étapes suivantes : 10s de dénaturation (98°C), 5s d'hybridation (55°C) et 1 mn d'élongation par kbp

Nom	Séquence	Utilisation
bceS_DB1/ XbaI	5'- GCT TCTAGA GATTAAAGCATTTCCTTATCGAAAGGCGG - 3'	Double hybride, Clonage bceS dans pUT18C et pKT25
bceS_DB2/ KpnI	5'- CGG GGTACC ATGTGAATATCGATGCCCTTCAG -3'	Double hybride, Clonage bceS dans pUT18C et pKT25
bceA_DB1/ XbaI	5'- GCT TCTAGA GGTGATTTTAGAAGCGAATAAAATTCG -3'	Double hybride, Clonage bceA dans pUT18C et pKT25
bceA_DB2/KpnI	5'- CGG GGTACC CGATCGCTAATGAACCGAAATAC -3'	Double hybride, Clonage bceA dans pUT18C et pKT25
bceB_DB1/ XbaI	5'- GCT TCTAGA GAACATTAATCAGCTCATCCTGC -3'	Double hybride, Clonage bceB dans pUT18C et pKT25
bceB_DB2/ KpnI	5'- CGG GGTACC GGAGCTTTTTCTGTTTCACAACG -3'	Double hybride, Clonage bceB dans pUT18C et pKT25
puT18C-5'	5'- AAGTTCTCGCCGGATGTACTGGAAA -3'	Séquençage puT18C en 5'
puT18C-3'	5'- TGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGC- 3'	Séquençage puT18C en 3'
pkT25-5'	5'- ATTATGCCGCATCTGTCCAACCTCC -3'	Séquençage pkT25 en 5'
pkT25-3'	5'- TTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAA -3'	Séquençage pkT25 en 3'
bceS XhoI	5'- CT CTCGAG ATACAGCGAAGCCTCTGAAATC -3'	Clonage <i>bceS</i> dans pNG214
bceS- EcoRI	5'- CT GAATTC CACGCTTATGACATGTTCAAATTG -3'	Clonage <i>bceS</i> dans pNG214
Pbcea2	5'- CGCCACGTGATGATGATGATGGTGCATTACGCAG TCTCCTTTAATTG -3'	Séquençage construction bceS-GST

Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisés

à amplifier (72°C), répétées sur 29 cycles. La réaction est réalisée dans un volume final de 50µL. L'ADN génomique de la souche 168 de *B. subtilis* est utilisé comme matrice et les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau 2. Ces dernières ont été choisies grâce au programme « primer-3 » (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) en utilisant les critères suivants : longueur moyenne de 23 nucléotides ; absence de structures secondaires (tige-boucle) ; pourcentage de G+C supérieur proche de 50% ; température d'hybridation comprise entre 55°C et 65°C ; un verrouillage G ou C en 3'. Les oligonucléotides sont fournis par Sigma-Genosys. Les produits d'amplification ainsi générés sont purifiés grâce au kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up system (Promega).

Techniques de clonage

Le clonage orienté des différents gènes, celui codant pour le phosphorelais BceS et ceux codant pour les deux sous-unités, BceA et BceB, du transporteur ABC dans pKT25 et PUT18C a été fait grâce aux amorces présentées dans le tableau 1, dans lesquelles ont été ajoutées les séquences correspondant aux sites enzymatiques, *XbaI* et *KpnI*.

Le plasmide pKT25 et PUT18C et les fragments PCR purifiés sont digérés successivement par *PmlI* et *AscI* à 10U/µg d'ADN à digérer. La ligation est réalisée la nuit à 16°C en présence de 10U/µg d'ADN de T4 DNA ligase (BioLabs) dans le tampon fourni. La ligation est réalisée avec un rapport molaire insert/vecteur = 2.

Ce fragment après digestion par l'enzyme *AscI* a été cloné dans le plasmide pbTy aux sites *PmlI* et *AscI*.

De la même manière, le clonage orienté de *bceS* dans le vecteur pNG214 a été fait grâce aux amorces présentées dans le tableau 1, dans lesquelles ont été ajoutées les séquences correspondant aux sites enzymatiques, *XhoI* et *EcoRI*.

Toutes les enzymes de restriction sont fournies par BioLabs.

Vérification de la séquence des fragments clonés.

Les plasmides contenant les zones à séquencer sont utilisés comme matrice. Les amorces utilisées pour le séquençage sont décrites dans le tableau 2. Les séquences d'ADN sont réalisées par Genome-Express.

Mesure de l'activité β -galactosidase

Comme pour le test sur boîte, les transformants sont cultivés en milieu LB contenant de l'IPTG, de l'ampicilline et de la kanamycine, pendant une nuit, à 30°C. Les activités β -galactosidase sont déterminées selon la méthode de Miller (Miller, 1972).

Lyse des cellules et fractionnement membranaire

La souche *Bs-bceS::GST* est cultivée en LB, à 37°C (2,5 litre de culture). Lorsque la DO₆₀₀ atteint 0,6 ou 0,8, de la bacitracine est ajoutée à une concentration finale de 20mg/ml, puis la croissance continue dans ces conditions pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite centrifugées 20 minutes à 4500G à 4°C, puis lavées dans du tampon phosphate salin et une nouvelle fois centrifugées 10 minutes à 5000G à 4°C. Le culot est repris dans 10ml d'un tampon A contenant du Tris HCL pH 8 50mM, MgCl₂ 5mM, du NaCl₂ 50mM, du dithiothréitol (DTT) 1mM, du protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), de la benzonase (Sigma-Aldrich), du lysozyme à une concentration de 10mg/ml, ainsi que du PMSF à une concentration de 100 μ M. Les cellules sont ensuite lysées, à froid, par trois passages successifs à la presse de French (1600psi). On prélève ici l'extrait cellulaire (1) (Fig.44). Les cellules lysées sont ensuite centrifugées 10 minutes à 10000G à 4°C, pour séparer le surnageant 1 (2) des débris cellulaires. Le surnageant 1 est ensuite centrifugé 50 minutes à 100 000G à 4°C. Ceci va permettre la séparation de la fraction soluble (3) et de la fraction membranaire (4). Cette dernière est alors reprise dans 1mL du tampon A.

Solubilisation des protéines membranaires

Les protéines présentes dans la fraction membranaire sont incubées avec du CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) à 0,8% final, pendant 2 heures, à température ambiante, sur une roue. Les protéines sont ensuite centrifugées 50 minutes à 100 000G à 4°C. Ceci va permettre de séparer les protéines solubilisées (surnageant, (5)) des débris membranaires (culot) (Fig.44).

Co-immunoprécipitation de BceS

Les protéines solubilisées (400 μ l) sont incubées avec 1ml de tampon A, du CHAPS à 0,8% final et 50 μ l de billes de sépharose couplées à un anticorps anti-GST (Sigma), préalablement équilibrées. L'incubation est réalisée sur la nuit, à 4°C, sur une roue. Le lendemain, le mélange est centrifugé 1 minute à 200G, ce qui va permettre de séparer les

billes, auxquelles sont fixées BceS-GST et ses interactants (6), et la fraction non retenue (7) (Fig.44). Les billes sont ensuite lavées trois fois avec du tampon A supplémenté de CHAPS à 0,8% final, puis reprises dans du tampon de charge. La fraction non retenue est précipitée au TCA à 15% final pendant 30 minutes dans de la glace, puis centrifugée pendant 15 minutes à 10 000G. Le culot contenant les protéines non retenues est supplémenté avec 500µl d'acétone, puis une nouvelle fois centrifugé, et enfin repris dans du tampon de charge.

Western Blot

Après dénaturation (10 min à 95°C), les différentes fractions obtenues sont chargées sur un gel à 15% de polyacrylamide/bis-acrylamide 37,5:1 et les protéines séparées. Un transfert des protéines sur une membrane Nitrocellulose Hybond (Amersham) est réalisé en condition semi-sèche. Après saturation de la membrane par de la Sérum Albumine Bovine (SAB), elle est incubée en présence du premier anticorps (anticorps de chèvre anti-GST ou de lapin anti-BceA ou de lapin anti-boucleBceB). Après lavage de la membrane, celle-ci est incubée avec un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire, et couplé à la phosphatase alcaline. L'activité de cette dernière est révélée, par une méthode colorimétrique, dans un tampon alcalin et en présence de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) et nitroblue tetrazolium (NBT) qui donnent la coloration bleue.

Discussion Générale et Perspectives

Le système de résistance à la bacitracine BceRSAB de *B. subtilis* représente le modèle des modules de détection/résistance aux antibiotiques peptidiques. Il associe un phosphorelais, dont le régulateur de réponse est de type OmpR à un transporteur ABC classé suivant les auteurs dans la famille 9 (Quentin et al., 1999) ou dans la famille des « peptide-7-exporters » (Saier et al., 2009). Ce module est original tant dans son mécanisme moléculaire qu'au niveau de certains de ses constituants qui présentent des caractéristiques singulières. Il a en effet été montré au laboratoire que le transporteur ABC BceA Bestimulé dans l'induction par la bacitracine de l'expression des ses propres gènes via le promoteur *PbceA* (Bernard et al., 2007). D'autre part, l'histidine kinase BceS de type IM-HK (Mascher, 2006) possède deux domaines transmembranaires séparés par une boucle extracytoplasmique de moins de vingt-cinq acides aminés et détecterait un signal membranaire. Le MSD BceB possède dix segments transmembranaires avec une boucle extracytoplasmique large entre les fragments 7 et 8. Deux modules similaires, PsdRSAB et YxjKLM, sont présents chez *B. subtilis* et sont eux aussi induits par la présence d'un antibiotique peptidique (enduracine et LL37, respectivement) et cette induction nécessite, dans le cas du module PsdRSAB, le transporteur ABC (F. Blanc, non publié).

Le but de mon travail de thèse était d'une part de compléter et d'élargir l'analyse effectuée dans notre laboratoire sur une cinquantaine de génomes (Joseph et al., 2002) et d'autre part de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression des gènes du transporteur de ces modules en m'intéressant plus particulièrement au modèle constitué par BceRSAB qui confère à *B. subtilis* la résistance à la bacitracine.

1) Les modules de détection/résistance aux antibiotiques

L'inventaire réalisé à partir de la connaissance de la séquence des génomes de plus de 800 bactéries a montré que ces modules sont apparus chez les Firmicutes, groupés dans lequel ils se sont maintenus et se sont largement répandus. Il est à noter que les gènes codant pour les quatre éléments composant les modules (Histidine Kinase, Régulateur de réponse, NBD et MSD) ont coévolué depuis leur émergence dans ce phylum et ont eu tendance à se maintenir à proximité sur le chromosome au cours de l'évolution. Il a, d'autre part, été mis en évidence de nombreux transferts horizontaux, des événements de duplication ou de perte de gènes qui révèle une histoire évolutive hautement dynamique de ces modules. Ces différents

événements ont conduit à leur grande diversité au sein des Firmicutes. Ces modules ont été dénommés Bce-like en référence au modèle BceRSAB de *B. subtilis*.

L'analyse phylogénétique fine de chacun des membres des modules Bce-like a été réalisée et a permis de proposer une classification en six sous-familles, qui a été validée récemment par un travail similaire réalisé par une autre équipe (Dintner et al., 2011). Le rôle important de ces modules dans la survie des bactéries en présence d'antibiotique pourrait expliquer leur maintien au cours de l'évolution après les nombreux transferts horizontaux et événements de duplication et de perte de gènes. En effet, certaines bactéries pathogènes du groupe des *Bacillus* ou des *Clostridia* possèdent un large éventail de modules Bce-like leur permettant potentiellement de résister à des antibiotiques différents.

2) Le fonctionnement du module BceRSAB

Afin de tenter d'appréhender le lien fonctionnel existant entre les différents composants de ces modules de détection/résistance, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au module BceRSAB de *B. subtilis* qui a été probablement le plus étudié. Nous avons réalisé des expériences d'échanges du transporteur BceAB avec ses orthologues, chez *B. subtilis*, qui montrent que la réponse à la bacitracine des souches correspondantes diminue en fonction de la distance phylogénétique entre le transporteur originel et les transports ABC utilisés pour le remplacer. Ceci nous a amené à émettre l'hypothèse d'un mécanisme d'activation faisant intervenir une interaction entre l'un des composants de l'ABC transporteur et l'histidine kinase BceS. En effet, la capacité d'interaction entre deux protéines diminue lorsque la distance phylogénétique entre ces deux protéines augmente. Dans le cadre de cette hypothèse, le transporteur ABC serait le premier senseur de la présence de bacitracine. Celui-ci interagirait alors avec l'histidine kinase et, le phosphorelais, ainsi activé, permettrait l'induction, par la bacitracine, des gènes codant pour le transporteur. Cependant, les expériences d'interaction protéine-protéine (double hybride et co-immunoprécipitation) que nous avons réalisées n'ont pu ni confirmer ni infirmer cette hypothèse. Il serait important dans un avenir proche d'améliorer ces approches ou d'en utiliser de nouvelles afin d'analyser le détail du mécanisme moléculaire de l'activation du système BceRSAB.

D'autre part, les expériences réalisées montrent l'importance de la boucle extracytoplasmique de BceB dans le fonctionnement du module BceRSAB. Rietkötter et

collaborateurs (Rietkötter et al., 2008), avaient publié des résultats préliminaires qui permettaient de supposer que la boucle de BceB jouait un rôle important dans la fonction du système BceRSAB. Nous avons effectivement démontré que tel était le cas. En effet, la délétion de cette boucle entraîne une chute drastique de la résistance à la bacitracine, ainsi que de l'induction par ce même antibiotique du promoteur *PbceA*.

Ce phénotype est complémenté par la réinsertion de la boucle à son emplacement initial.

De la même manière, lorsque le transporteur YtsCD de *B. licheniformis* est délété de la boucle de YtsD, il est lui aussi incapable de participer à l'activation du promoteur de *bceA* en présence de bacitracine chez *B. subtilis* et donc de conférer la résistance à cet antibiotique.

L'équipe de Mascher a proposé que la boucle détecterait directement la bacitracine extracellulaire (Rietkötter et al., 2008). Des résultats obtenus précédemment au laboratoire montrent que l'undécaprényl pyrophosphate (UPP) joue un rôle important dans le fonctionnement du module BceRSAB (Bernard et al., 2007) et nous proposons que ce soit plutôt le complexe UPP-bacitracine qui soit détecté. Cette détection déclencherait la cascade de phosphorylation de BceRS qui, à son tour, permettrait d'activer la transcription des gènes codants pour le transporteur ABC BceAB, dont le rôle serait, pour l'équipe de Mascher, d'importer la bacitracine à l'intérieur de la cellule (Rietkötter et al., 2008). Notons que cette hypothèse du transporteur ABC fonctionnant comme importeur d'antibiotiques a également été faite par le groupe de T. Msadek pour VraDE de *S. aureus* (Hiron et al., 2011).

3) Les transporteurs des modules de détection/résistance sont-ils des importeurs ou des exporteurs ?

Divers éléments vont à l'encontre de l'hypothèse d'un transporteur fonctionnant comme un importeur. Le premier d'entre eux est que de manière systématique les critères de comparaison de séquences ont toujours amené à classer dans les bases de données (ABCdb (An ABC transporter database), <http://www-abcd.biotoul.fr/>, (Quentin and Fichant, 2000), TCDB (The Transporter Classification Database), <http://www.tcdb.org/>, (Saier et al., 2009)) les transporteurs ABC de ce type parmi les exporteurs.

Rietkötter et ses collaborateurs (Rietkötter et al., 2008) ont émis l'hypothèse que BceAB de *B. subtilis* fonctionnait comme un importeur sur des critères de topologie de la MSD. En

effet, par comparaison avec les importeurs formés de l'association de la MSD et de la protéine affine ou SBP (Substrate Binding Protein)(Van Der Heide and Poolman, 2002), ces auteurs

postulent que la boucle extracytoplasmique pourrait jouer le rôle de protéine affine. Une modélisation de la structure de la boucle réalisée au laboratoire montre que celle-ci ne possède aucune des caractéristiques structurales bien particulières des SBP ce qui n'est pas en faveur de cette hypothèse (Résultats non publiés).

D'autre part, on s'attendrait à voir une conservation de la séquence de la boucle dans des translocateurs prenant en charge le même allocrite. De façon étonnante, nous avons montré que la boucle de translocateurs conférant une résistance à un même antibiotique est la partie la moins conservée de ces protéines. Ce résultat est à relativiser car les boucles sont néanmoins mieux conservées au sein d'une sous-famille reconnaissant le même ligand qu'entre membres de sous-familles reconnaissant des ligands différents. De plus, Hiron et ses collaborateurs ont réussi à changer la spécificité d'un transporteur par le simple changement de la boucle du translocateur (Hiron et al., 2011).

Finalement, si l'antibiotique était importé que deviendrait-il ? Dans le cas de la bacitracine, on pourrait penser qu'une fois dans le cytoplasme elle ne serait plus en contact avec sa cible l'UPP puisque celui-ci semble être déphosphorylé dans le périplasma de *E. coli* et donc se retrouve sous forme UP coté cytoplasme (Touzé et al., 2008). Cependant, à l'intérieur de la bactérie, la bacitracine serait toujours capable d'interagir avec l'UPP issus de la synthèse *de novo* de l'UP (Touzé et al., 2008) ce qui conduirait finalement à une diminution du pool d'UP dans la cellule et à un blocage de la synthèse du peptidoglycane. Pour que cette hypothèse soit plausible, il est donc nécessaire de postuler qu'une fois à l'intérieur de la cellule la bacitracine soit dégradée. Compte-tenu des concentrations de bacitracine auxquelles *B. subtilis* est résistante (de l'ordre de 300 µg/ml) et l'importeur étant actif, on s'attendrait à avoir une accumulation massive de l'antibiotique dans le cytoplasme. Il nous paraît alors vraisemblable qu'un système de dégradation spécifique soit contrôlé par la présence de bacitracine. Un tel système n'a jamais été mis en évidence par les diverses approches de transcriptomique qui ont été réalisées (Kobayashi et al., 2001; Mascher et al., 2003).

En conclusion nous maintenons notre hypothèse d'un transporteur ABC fonctionnant dans les modules détection/résistance comme un exporteur.

Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de parvenir à suivre le devenir de l'antibiotique. Nous nous proposons, dans le cas de la bacitracine, de réaliser un marquage par fluorescence, qui bien que difficile à mettre en œuvre puisqu'il faut conserver l'activité de l'antibiotique, nous permettra de localiser la molécule dans la cellule. Des expériences visant à lier de façon covalente un fluorochrome de petite taille à la bacitracine

sont actuellement initiées au laboratoire. L'étude de la localisation de la bacitracine marquée
pourra alors être

réalisée avec des souches sensibles (délétées des gènes *bceA* et *bceB* ou de la partie codant pour la boucle de BceB), sauvage ou au contraire surproduisant le transporteur ABC BceAB.

4) Rôle fonctionnel de la boucle extracytoplasmique de la MSD (translocateur ou perméase).

La très grande variabilité des séquences de la boucle du translocateur reste surprenante compte tenu de son importance dans l'induction du système ou dans le processus de résistance. Afin de mieux appréhender son rôle fonctionnel, nous avons échangé les boucles de MSD appartenant à des transporteurs de même spécificité. Quatre des transporteurs de la sous-famille IV étant impliqués dans la résistance à la bacitracine,

nous avons réalisé des échanges de boucles à un niveau de la MSD de *B. subtilis*, BceB. Seule la boucle de YtsD de *B.*

licheniformis est capable de restaurer très partiellement la capacité du transporteur BceAB à participer à l'activation du promoteur *P_{bceA}* en présence de bacitracine chez *B. subtilis*. Cependant, ce transporteur hybride n'est pas capable de protéger la bactérie de l'action de la bacitracine.

La possibilité d'une interaction entre la boucle et une autre partie du transporteur ABC pourrait expliquer cette situation. Dans ce contexte,

la distance phylogénétique entre les boucles remplacées et celle de BceB pourrait expliquer la perte de leur capacité à interagir avec une autre partie du transporteur ABC et donc l'incapacité de ces hybrides à induire l'activation du promoteur *P_{bceA}* et à permettre la résistance à la bacitracine.

Le fait que d'autres parties du transporteur ABC, comme la boucle extracytoplasmique ² (O₂), soient peu conservées confortent cette hypothèse (FigS7, supplementary data). Si cette hypothèse est vraie, on devrait pouvoir obtenir, à partir des souches contenant BceB avec la boucle de YtsD de *B. licheniformis*, des mutations suppressives permettant de rétablir pleinement l'induction et la résistance à la bacitracine. Des expériences de mutagenèse aléatoire sur la large boucle de YtsD ont été entreprises pour tester cette proposition. L'étude des séquences de ces mutants devrait nous permettre d'identifier les acides aminés importants dans le rôle de la boucle. L'opération symétrique, consistant à réaliser une mutagenèse aléatoire sur les zones hors boucle du translocateur YtsD de *B. licheniformis* possédant la boucle de BceB de *B. subtilis*, pourrait également être réalisée.

La fonction de la boucle extracytoplasmique du translocateur est donc extrêmement importante dans le module BceRSAB, que ce soit au niveau de la régulation du système ou au

niveau de la résistance à la bacitracine. Une généralisation, plus formelle, de l'importance fonctionnelle de cette boucle à d'autres modules reste cependant à entreprendre.

5) Les transporteurs ABC et leur spécificité

La sous-famille IV, outre BceAB de *B. subtilis*, contient d'autres transporteurs ABC impliqués ou potentiellement impliqués dans la résistance à la bacitracine comme VraDE de *S. aureus*, YtsCD de *B. licheniformis* ou BceAB de *B. halodurans*. Utilisant *B. subtilis* comme hôte, nous avons testé les transporteurs ABC de ces différents modules pour leurs capacités à remplacer le transporteur de l'hôte, leurs gènes ayant été introduits à la place de *bceAB* et placés sous le contrôle du promoteur *PbceA*.

En surproduisant le régulateur de réponse BceR et donc en s'affranchissant de la présence de bacitracine pour l'activation du promoteur *PbceA*, nous avons montré que BceAB de *B. halodurans* et YtsCD de *B. licheniformis* sont très probablement impliqués dans la résistance à la bacitracine dans leur hôte d'origine puisqu'ils rétablissent la résistance d'un mutant *bceAB* de *B. subtilis*, donnant ainsi une fonction à ces protéines.

La spécificité des transporteurs peut-elle être prédite à partir de la connaissance de leur position dans l'arbre phylogénétique de ces derniers? Il semble que non, car si au moins quatre transporteurs de la famille IV, BceAB de *B. subtilis*, YtsCD de *B. licheniformis*, BceAB de *B. halodurans* et VraDE de *S. aureus*, reconnaissent la bacitracine comme allocrite, des transporteurs d'autres familles ont également la même spécificité. En effet, deux transporteurs de la sous-famille II, BceAB de *S. mutans* et YP_001835606/YP_001835607 de *S. pneumoniae*, et un transporteur de la sous-famille V, AnrAB de *L. monocytogenes*, permettent à leurs bactéries respectives de résister à la bacitracine (Ouyang et al., 2010; Tsuda et al., 2002; Becker et al., 2009; Majchrzykiewicz et al., 2010; Collins et al., 2010). Par ailleurs, les modules d'une même sous famille peuvent avoir une spécificité différente. Par exemple, VraFG de *S. aureus*, qui appartient à la sous-famille IV, contribue à la résistance à la vancomycine chez sa bactérie hôte (Meehl et al., 2007).

Une complexité supplémentaire apparaît puisqu'un transporteur donné ne présente pas une spécificité restreinte à un antibiotique, au moins en ce qui concerne sa capacité à protéger une bactérie. En effet, il a été montré que BceAB protégeait *B. subtilis* non seulement de l'action de la bacitracine mais également, bien qu'avec une moindre efficacité, de celle de

l'actagardine, de la mersacidine(Staroń et al., 2011) mais aussi de celle d'une défensine, la plectasine(Schneider et al., 2010). VraDE est impliqué quant à lui dans la résistance de *S. aureus* à la bacitracine et à la nisine(Staroń et al., 2011). PsdAB présente une spécificité plus large puisque conférant à *B. subtilis* la résistance à l'enduracidine, la gallidermine, la nisine et la subtiline(Staroń et al., 2011). Il semblerait donc que ces transporteurs puissent être considérés comme des MDR (Multi Drug Resistant). Quelle est donc la véritable nature du stimulus perçu par ces transporteurs ? Le point commun de ces différents antibiotiques est qu'ils ont un mode d'action similaire : ils sont tous capables d'interagir avec l'UPP, que ce soit *via* une interaction avec le lipide II ou directement, lors de l'étape de régénération de l'UP. Ainsi, il est possible que l'inducteur des gènes codant pour ces transporteurs soit le complexe antibiotique/UPP plutôt que l'antibiotique seul, et que le transporteur en lui-même transporte le complexe comme nous l'avons suggéré dans le cas de la bacitracine (Bernard 2007). (Bernard et al., 2007).

La purification du transporteur et l'étude directe de ses capacités à prendre en charge des antibiotiques (en présence ou en l'absence de leur cible) permettraient de résoudre ces divers problèmes (voir plus loin dans le cas de l'étude du transport de bacitracine par BceAB).

6) Spécificité au niveau de l'induction des modules

Bien que PsdRSAB ne confère pas la résistance à l'actagardine chez *B. subtilis*, cet antibiotique induit l'expression des gènes codant pour le transporteur de ce module et ce à un niveau supérieur à celui obtenu avec tous les autres antibiotiques qui sont pris en charge par le transporteur pour détoxifier la bactérie(Staroń et al., 2011).

Ce résultat est étonnant puisque dans l'hypothèse d'un mécanisme de régulation où le transporteur ABC serait le premier senseur, il faut admettre qu'une substance non prise en charge par le transporteur serait néanmoins capable d'activer ce dernier qui, à son tour, activerait l'histidine kinase.

Au vu des résultats obtenus pendant cette thèse, nous proposons un modèle qui tente de prendre en compte les divers points importants que nous avons mentionnés concernant le mode de fonctionnement du module BceRSAB. Dans ce modèle, la bacitracine diffuserait dans le peptidoglycane pour aller directement se fixer à l'UPP au niveau de la membrane

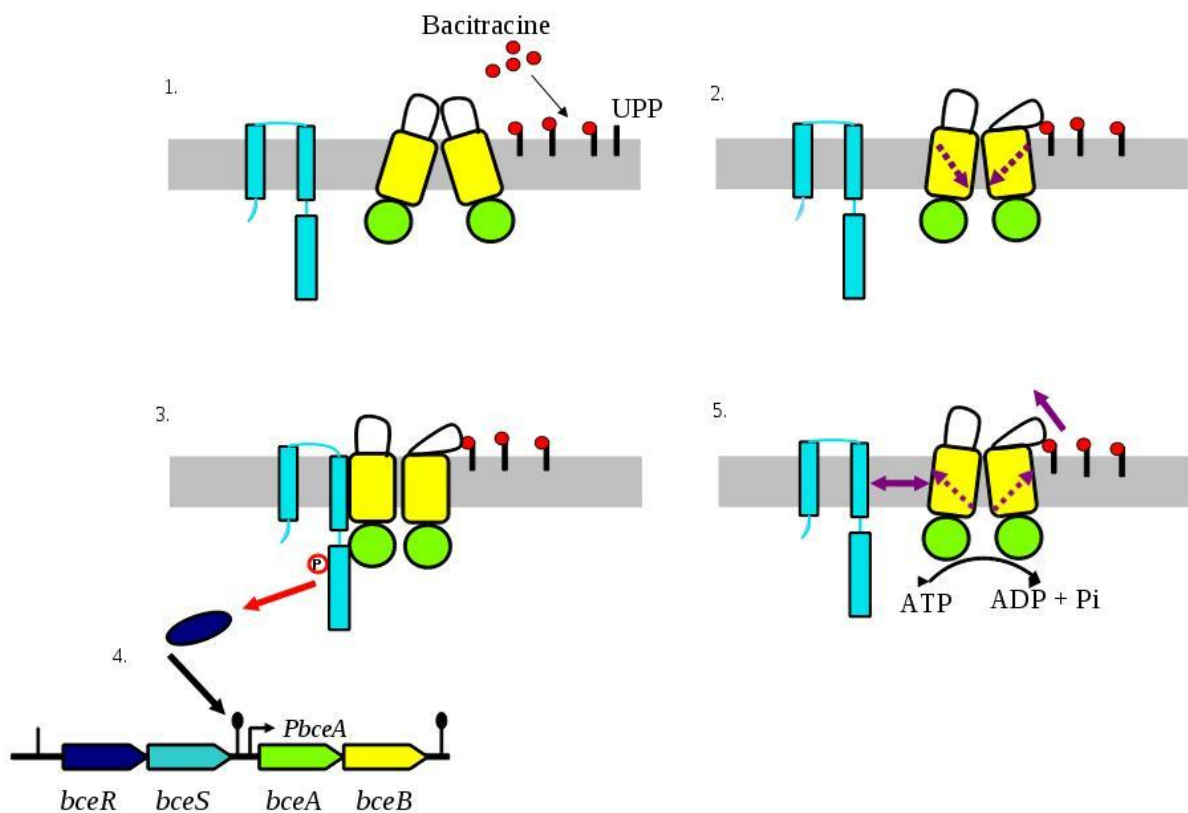


Fig.46 : Modèle d'activation du système BceRSAB.

1. La bacitracine pénètre jusqu'à la membrane et se fixe à l'UPP. La conformation ouverte du transporteur ABC (NBD en vert et MSD en jaune) empêche l'interaction avec le senseur BceS (bleu clair). Le système est inactif.
2. La boucle extracytoplasmique de BceB va interagir avec la bacitracine complexée à l'UPP, induisant un changement conformationnel du transporteur ABC vers une conformation fermée.
3. Dans cette conformation fermée, le transporteur peut alors interagir avec le senseur pour l'activer et induire la cascade de phosphorylation.
4. Le régulateur BceR (bleu foncé) actif va alors activer le promoteur *PbceA* et donc permettre l'expression des gènes du transporteur BceAB.
5. L'hydrolyse de l'ATP induit un retour du transporteur ABC vers sa conformation ouverte. Ce processus permet la réorientation de la boucle de BceB, ce qui entraîne la bacitracine et assure son relargage dans le milieu extérieur. Le système est ainsi retourné à son état originel.

bactérienne, formant ainsi un complexe UPP/bacitracine (Fig.46). Le transporteur étant en conformation ouverte, la boucle extracytoplasmique de BceB pourrait alors interagir avec la bacitracine (ou le complexe UPP/bacitracine). Cette interaction engendrerait un blocage du transporteur dans une conformation dite « fermée », qui serait alors apte à interagir avec le senseur BceS, activant ainsi le phosphorelay et permettant l'expression de *bceAB*. L'hydrolyse de l'ATP va induire un changement conformationnel du transporteur, réorientant la boucle extracytoplasmique qui entraînerait la bacitracine, la relargant dans le milieu extérieur. Le transporteur ABC fonctionnerait donc littéralement comme un « aspirateur ».

Il est à noter que ce modèle peut être appliqué au cas du module complexe BraRSDE, VraDE de *S. aureus* (Hiron et al., 2011). Le couple BraRSDE présenterait le même mode de fonctionnement que celui indiqué ci-dessus, si ce n'est que BraDE n'assurerait pas la phase d'entraînement de la bacitracine, la boucle de BraE présentant une trop faible affinité pour l'antibiotique. Par contre, le transporteur VraDE dans le même processus mais sans interagir avec l'histidine kinase BraS prendrait en charge l'export de l'antibiotique du fait de la forte affinité de la boucle de VraE pour la bacitracine.

De nombreux points restent à éclaircir pour nous permettre de comprendre le fonctionnement du système BceRSAB et des modules Bce-like. Le premier concerne l'identification de l'allocrite pris en charge par le transporteur BceAB (la bacitracine, le complexe UPP/bacitracine...). Nous nous proposons de mesurer l'augmentation de l'activité ATPasique qui apparaît lorsque le transporteur ABC interagit avec son allocrite. Nous tenterons donc de purifier le transporteur ABC afin de reconstituer des protéoliposomes contenant exclusivement ce transporteur, puis de soumettre à ces protéoliposomes différents types d'allocrites et de mesurer l'activité ATPasique du transporteur.

Un autre point important serait de vérifier que la boucle est réellement capable de reconnaître l'allocrite transporté. Pour cela, nous pourrions utiliser une approche utilisant la résonance du plasmon (Biacore), afin de mesurer en temps réel l'interaction entre deux partenaires. D'autre part, nous pourrions également tester l'influence de la surproduction de la boucle extracytoplasmique (produite par exemple avec les deux fragments transmembranaires l'encadrant afin d'assurer son maintien à la membrane) sur la réponse du module BceRSAB à

la bacitracine. En effet, si l'allocrite interagit avec la boucle, la surproduction de celle-ci devrait le titrer et donc diminuer la réponse.

Il serait également intéressant de décortiquer le mécanisme moléculaire qui permet au transporteur de participer à la régulation du système. Nous avons déjà abordé cette question en réalisant les échanges de transporteur et différentes expériences d'interactions protéine/protéine. Ces dernières n'ayant apporté aucun résultat probant, il paraît nécessaire d'utiliser de nouvelles approches pour tenter de mettre en évidence une éventuelle interaction entre le transporteur BceAB et le senseur BceS. Des techniques de transfert de fluorescence ou de bioluminescence (FRET ou BiFC) ou d'autres méthodes biochimiques, comme le pull-down ou le Tap-Tag, pourraient être utilisées. Dans la même optique, il serait intéressant de procéder à des expériences de mutagenèse dirigées sur les domaines membranaires du senseur et du transporteur et d'analyser le phénotype résultant de ces mutations en termes d'activation de l'expression du transporteur. Ceci pourrait permettre de préciser les domaines importants de chacun des deux partenaires, qui interviendraient dans la régulation du système ou dans l'interaction potentielle entre les deux partenaires.

Enfin, la généralisation du mode de fonctionnement des modules Bce-like reste à faire. Ces modules sont-ils tous induits par la présence d'un antibiotique ciblant la paroi bactérienne, sont-ils tous capables de conférer une résistance à ce type d'antibiotique ? Est-ce que le fonctionnement moléculaire est similaire pour tous ces modules ? La présence de la boucle de la MDS est-elle toujours indispensable à l'activation du système et à la résistance ? De nombreuses questions restent donc en suspens, mais nous faisons le pari que tous les modules Bce-like possèdent un mécanisme de régulation similaire à celui du système BceRSAB.

Conclusion

La mise en évidence d'un grand nombre de modules de détection/résistance aux antibiotiques peptidiques restreints aux Firmicutes et l'originalité de leur mécanisme moléculaire de fonctionnement les rendent très intéressants d'un point de vue fondamental. Au niveau appliqué, la recherche systématique des substances prises en charge par ces modules devrait permettre soit la découverte de nouveaux antibiotiques peptidiques, soit d'attribuer à un antibiotique donné l'un des systèmes de détoxification bactérien qui lui est dédié. Ce point est capital puisque l'émergence de bactéries présentant des résistances aux antibiotiques utilisés en thérapie humaine rend nécessaire la découverte de nouvelles molécules, dont notre société a besoin pour combattre ces bactéries. Dans ce contexte, la connaissance fine du fonctionnement des modules de résistance faciliterait la recherche de drogues les inhibant, rendant ainsi possible l'utilisation d'inhibiteurs de ces modules en association avec l'antibiotique, ce qui faciliterait la lutte contre les nombreuses bactéries pathogènes du groupe des Firmicutes.

Références Bibliographiques

- Abee, T., Klaenhammer, T.R., and Letellier, L. (1994). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl Environ Microbiol* 60, 1006-013.
- Albrich, W.C., Monnet, D.L., and Harbarth, S. (2004). Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg Infect Dis* 10, 514-17.
- Ames, G.F., Mimura, C.S., and Shyamala, V. (1990). Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases. *FEMS Microbiol Rev* 6, 429-446.
- Archibald, L., Phillips, L., Monnet, D., McGowan, J.E., Tenover, F., and Gaynes, R. (1997). Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 24, 211-15.
- Arthur, M., and Quintiliani, R. (2001). Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 375-381.
- Arthur, M., Molinas, C., and Courvalin, P. (1992). The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 174, 2582-591.
- Arthur, M., Molinas, C., Bugg, T.D., Wright, G.D., Walsh, C.T., and Courvalin, P. (1992). Evidence for in vivo incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 867-69.
- Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F., and Courvalin, P. (1993). Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 175, 117-127.
- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K., and Campos-Takaki, G.M. (1993). Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Extraction, purification, and characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 42, 1-7.
- Baba, T., and Schneewind, O. (1998). Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. *Trends Microbiol* 6, 66-71.
- Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., and Kurahashi, K. (1985). Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J Biochem* 98, 585-603.
- Bachelier, A., Mayer, R., and Klein, C.D. (2006). Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 5605-09.
- Bader, M.W., Sanowar, S., Daley, M.E., Schneider, A.R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R.E., Le Moual, H., and Miller, S.I. (2005). Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 122, 461-472.
- Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., and Aarestrup, F.M. (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med* 31, 95-112.
- Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32, 168-207.
- Baum, E.Z., Crespo-Carbone, S.M., Foleno, B.D., Simon, L.D., Guillemont, J., Macielag, M., and Bush, K. (2009). MurF inhibitors with antibacterial activity: effect on muropeptide levels. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3240-47.
- Bay, D.C., Rommens, K.L., and Turner, R.J. (2008). Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1814-838.

- Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72-74.
- Becker, P., Hakenbeck, R., and Henrich, B. (2009). An ABC transporter of *Streptococcus pneumoniae* involved in susceptibility to vancomycin and bacitracin. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2034-041.
- Bernard, R., El Ghachi, M., Mengin-Lecreulx, D., Chippaux, M., and Denizot, F. (2005). BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem* 280, 28852-57.
- Bernard, R., Guiseppi, A., Chippaux, M., Foglino, M., and Denizot, F. (2007). Resistance to bacitracin in *Bacillus subtilis*: unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes. *J Bacteriol* 189, 8636-642.
- Bernard, R., Joseph, P., Guiseppi, A., Chippaux, M., and Denizot, F. (2003). YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 228, 93-97.
- Bernat, B.A., Laughlin, L.T., and Armstrong, R.N. (1997). Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry* 36, 3050-55.
- Bierbaum, G., and Sahl, H.G. (1985). Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol* 141, 249-254.
- Bishop, R.E., Gibbons, H.S., Guina, T., Trent, M.S., Miller, S.I., and Raetz, C.R. (2000). Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J* 19, 5071-080.
- Blake, K.L., Randall, C.P., and O'Neill, A.J. (2011). In vitro studies indicate a high resistance potential for the lantibiotic nisin in *Staphylococcus aureus* and define a genetic basis for nisin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 2362-68.
- Blight, M.A., Pimenta, A.L., Lazzaroni, J.C., Dando, C., Kotelevets, L., Séror, S.J., and Holland, I.B. (1994). Identification and preliminary characterization of temperature-sensitive mutations affecting HlyB, the translocator required for the secretion of haemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 245, 431-440.
- Boman, H.G. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 61-92.
- Bouhss, A., Josseume, N., Severin, A., Tabei, K., Hugonnet, J.E., Shlaes, D., Mengin-Lecreulx, D., Van Heijenoort, J., and Arthur, M. (2002). Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *J Biol Chem* 277, 45935-941.
- Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D., and Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* 32, 208-233.
- Bourgault, A.M., Lamothe, F., Loo, V.G., Poirier, L., and CDAD-CSI Study Group (2006). In vitro susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates from a multi-institutional outbreak in Southern Québec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3473-75.
- Braibant, M., Gilot, P., and Content, J. (2000). The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* 24, 449-467.
- Brandish, P.E., Kimura, K.I., Inukai, M., Southgate, R., Lonsdale, J.T., and Bugg, T.D. (1996). Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1640-44.
- Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 415, 335-377.

- Breukink, E., and de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov* 5, 321-332.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H., and de Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286, 2361-64.
- Bridges, B.A. (2001). Hypermutation in bacteria and other cellular systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 29-39.
- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3, 238-250.
- Bronson, J.J., DenBleyker, K.L., Falk, P.J., Mate, R.A., Ho, H.T., Pucci, M.J., and Snyder, L.B. (2003). Discovery of the first antibacterial small molecule inhibitors of MurB. *Bioorg Med Chem Lett* 13, 873-75.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Leopold, K., Reynolds, P.E., and Sahl, H.G. (1998). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 154-160.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P.E., and Sahl, H.G. (1997). The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur J Biochem* 246, 193-99.
- Bugg, T.D., Braddick, D., Dowson, C.G., and Roper, D.I. (2011). Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends Biotechnol* 29, 167-173.
- Bugg, T.D.H. (1999). Bacterial peptidoglycan biosynthesis and its inhibition. *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 3)
- Burbulys, D., Trach, K.A., and Hoch, J.A. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64, 545-552.
- Cao, M., and Helmann, J.D. (2002). Regulation of the *Bacillus subtilis* *bcrC* bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors. *J Bacteriol* 184, 6123-29.
- Cao, M., Wang, T., Ye, R., and Helmann, J.D. (2002). Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* sigma(W) and sigma(M) regulons. *Mol Microbiol* 45, 1267-276.
- Carballido-López, R., and Errington, J. (2003). The bacterial cytoskeleton: in vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev Cell* 4, 19-28.
- Chalker, A.F., Ingraham, K.A., Lunsford, R.D., Bryant, A.P., Bryant, J., Wallis, N.G., Broskey, J.P., Pearson, S.C., and Holmes, D.J. (2000). The *bacA* gene, which determines bacitracin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, is also required for virulence. *Microbiology* 146 (Pt 7), 1547-553.
- Chambers, H.F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 10, 781-791.
- Chen, C.L., Chang, L.K., Chang, Y.S., Liu, S.T., and Tschen, J.S. (1995). Transposon mutagenesis and cloning of the genes encoding the enzymes of fengycin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 248, 121-25.
- Chen, X., Ansai, T., Awano, S., Iida, T., Barik, S., and Takehara, T. (1999). Isolation, cloning, and expression of an acid phosphatase containing phosphotyrosyl phosphatase activity from *Prevotella intermedia*. *J Bacteriol* 181, 7107-114.
- Chen, Y., Zhang, W., Shi, Q., Heseck, D., Lee, M., Mobashery, S., and Shoichet, B.K. (2009). Crystal structures of penicillin-binding protein 6 from *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* 131, 14345-354.
- Clewell, D.B., Flannagan, S.E., and Jaworski, D.D. (1995). Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* 3, 229-236.

- Collins, B., Curtis, N., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2010). The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin, and various beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 4416-423.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G., and van Sinderen, D. (1993). Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 8, 821-831.
- Cudic, P., Kranz, J.K., Behenna, D.C., Kruger, R.G., Tadesse, H., Wand, A.J., Veklich, Y.I., Weisel, J.W., and McCafferty, D.G. (2002). Complexation of peptidoglycan intermediates by the lipoglycopeptide antibiotic ramoplanin: minimal structural requirements for intermolecular complexation and fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7384-89.
- Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P., Héchard, Y., and European *Listeria* Genome Consortium (2001). A sigma(54)-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147, 3263-69.
- Daniel, R.A., Drake, S., Buchanan, C.E., Scholle, R., and Errington, J. (1994). The *Bacillus subtilis* spoVD gene encodes a mother-cell-specific penicillin-binding protein required for spore morphogenesis. *J Mol Biol* 235, 209-220.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., and Errington, J. (2000). Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 35, 299-311.
- Davidson, A.L., and Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* 73, 241-268.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 317-64, table of contents.
- Dawson, R.J., and Locher, K.P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443, 180-85.
- Debabov, D.V., Kiriukhin, M.Y., and Neuhaus, F.C. (2000). Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: role of DltD in D-alanylation. *J Bacteriol* 182, 2855-864.
- Den Blaauwen, T., Aarsman, M.E., Vischer, N.O., and Nanninga, N. (2003). Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Mol Microbiol* 47, 539-547.
- den Blaauwen, T., de Pedro, M.A., Nguyen-Distèche, M., and Ayala, J.A. (2008). Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol Rev* 32, 321-344.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2384-89.
- Dintner, S., Staron, A., Berchtold, E., Petri, T., Mascher, T., and Gebhard, S. (2011). Co-evolution of ABC-transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes bacteria. *J Bacteriol*
- Divakaruni, A.V., Baida, C., White, C.L., and Gober, J.W. (2007). The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol Microbiol* 66, 174-188.
- Dong, J., Lai, R., Nielsen, K., Fekete, C.A., Qiu, H., and Hinnebusch, A.G. (2004). The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J Biol Chem* 279, 42157-168.
- Dong, J., Yang, G., and McHaourab, H.S. (2005). Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA. *Science* 308, 1023-28.

- Dowson, C.G., Coffey, T.J., and Spratt, B.G. (1994). Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol* 2, 361-66.
- Dowson, C.G., Hutchison, A., Brannigan, J.A., George, R.C., Hansman, D., Liñares, J., Tomasz, A., Smith, J.M., and Spratt, B.G. (1989). Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8842-46.
- Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., et al. (1999). The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13294-99.
- Dürr, M., and Peschel, A. (2002). Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun* 70, 6515-17.
- Ehmann, D.E., Demeritt, J.E., Hull, K.G., and Fisher, S.L. (2004). Biochemical characterization of an inhibitor of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramyl-l-alanine ligase. *Biochim Biophys Acta* 1698, 167-174.
- Ehrenstein, G., and Lecar, H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* 10, 1-34.
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2004). The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem* 279, 30106-113.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* 24, 85-106.
- Eppelmann, K., Doekel, S., and Marahiel, M.A. (2001). Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 276, 34824-831.
- Epperson, J.D., and Ming, L.J. (2001). Cobalt (II) and copper (II) binding of *Bacillus cereus* trinuclear phospholipase C: a novel 1H NMR spectrum of a [] Tri-Cu (II)'center in protein. *J Inorg Biochem* 87, 149-156.
- Esue, O., Cordero, M., Wirtz, D., and Tseng, Y. (2005). The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J Biol Chem* 280, 2628-635.
- Fabret, C., Feher, V.A., and Hoch, J.A. (1999). Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* 181, 1975-983.
- Feng, Z., and Barletta, R.G. (2003). Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-alanine:D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 283-291.
- Figenschou, K.J., Froholm, L.O., and Laland, S.G. (1967). Studies on the biosynthesis of gramicidin S in a cell-free system from *Bacillus brevis*. Further attempts to elucidate its mechanism of synthesis. *Biochem J* 105, 451-53.
- Fillgrove, K.L., Pakhomova, S., Newcomer, M.E., and Armstrong, R.N. (2003). Mechanistic diversity of fosfomycin resistance in pathogenic microorganisms. *J Am Chem Soc* 125, 15730-31.
- Freeman, J.A., and Bassler, B.L. (1999). Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 181, 899-906.
- Frick, I.M., Akesson, P., Rasmussen, M., Schmidtchen, A., and Björck, L. (2003). SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J Biol Chem* 278, 16561-66.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis

- Froyshov, O., and Laland, S.G. (1974). On the biosynthesis of bacitracin by a soluble enzyme complex from *Bacillus licheniformis*. *Eur J Biochem* 46, 235-242.
- Fujihashi, M., Zhang, Y.W., Higuchi, Y., Li, X.Y., Koyama, T., and Miki, K. (2001). Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4337-342.
- Garrido, M.C., Herrero, M., Kolter, R., and Moreno, F. (1988). The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J* 7, 1853-862.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G., and Shai, Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34, 11479-488.
- Gazit, E., Lee, W.J., Brey, P.T., and Shai, Y. (1994). Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* 33, 10681-692.
- Gazit, E., Miller, I.R., Biggin, P.C., Sansom, M.S., and Shai, Y. (1996). Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J Mol Biol* 258, 860-870.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Itoh, T., and Tomizawa, J.I. (1977). Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 4772-76.
- Gerharz, T., Reinelt, S., Kaspar, S., Scapozza, L., and Bott, M. (2003). Identification of basic amino acid residues important for citrate binding by the periplasmic receptor domain of the sensor kinase CitA. *Biochemistry* 42, 5917-924.
- Gilles-Gonzalez, M.A., and Gonzalez, G. (1993). Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* 268, 16293-97.
- Gitai, Z., Dye, N., and Shapiro, L. (2004). An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8643-48.
- Goetsch, W., Geubbels, E., Wannet, W., Hendrix, M.G., Wagenvoort, J.H., and De Neeling, A.J. (2000). MRSA in nursing homes in the Netherlands 1989 to 1998: a developing reservoir? *Euro Surveill* 5, 28-31.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.M. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1079-093.
- Goossens, H. (2009). Antibiotic consumption and link to resistance. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 3, 12-15.
- Gootz, T.D. (2004). Global dissemination of beta-lactamases mediating resistance to cephalosporins and carbapenems. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2, 317-327.
- Gravesen, A., Ramnath, M., Rechinger, K.B., Andersen, N., Jänsch, L., Héchard, Y., Hastings, J.W., and Knøchel, S. (2002). High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 148, 2361-69.
- Grebe, T.W., and Stock, J.B. (1999). The histidine protein kinase superfamily. *Advances in microbial physiology* 41, 139-227.
- Grigoryan, L., Burgerhof, J.G., Haaijer-Ruskamp, F.M., Degener, J.E., Deschepper, R., Monnet, D.L., Di Matteo, A., Scicluna, E.A., Bara, A.C., et al. (2007). Is self-medication with antibiotics in Europe driven by prescribed use? *J Antimicrob Chemother* 59, 152-56.
- Groeger, W., and Köster, W. (1998). Transmembrane topology of the two FhuB domains representing the hydrophobic components of bacterial ABC transporters involved in the uptake of siderophores, haem and vitamin B12. *Microbiology* 144 (Pt 10), 2759-769.

- Groisman, E.A., Parra-Lopez, C., Salcedo, M., Lipps, C.J., and Heffron, F. (1992). Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11939-943.
- Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., and Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 141-155.
- Gu, Y.G., Florjancic, A.S., Clark, R.F., Zhang, T., Cooper, C.S., Anderson, D.D., Lerner, C.G., McCall, J.O., Cai, Y., et al. (2004). Structure-activity relationships of novel potent MurF inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 267-270.
- Guina, T., Yi, E.C., Wang, H., Hackett, M., and Miller, S.I. (2000). A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* 182, 4077-086.
- Guo, L., Lim, K.B., Gunn, J.S., Bainbridge, B., Darveau, R.P., Hackett, M., and Miller, S.I. (1997). Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science* 276, 250-53.
- Guo, L., Lim, K.B., Poduje, C.M., Daniel, M., Gunn, J.S., Hackett, M., and Miller, S.I. (1998). Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 95, 189-198.
- Gutmann, L., Al-Obeid, S., Billot-Klein, D., Ebnet, E., and Fischer, W. (1996). Penicillin tolerance and modification of lipoteichoic acid associated with expression of vancomycin resistance in VanB-type *Enterococcus faecium* D366. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 257-59.
- Guzman, J.D., Gupta, A., Evangelopoulos, D., Basavannacharya, C., Pabon, L.C., Plazas, E.A., Muñoz, D.R., Delgado, W.A., Cuca, L.E., et al. (2010). Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 65, 2101-07.
- Haavik, H.I., and Froyshov, O. (1975). Function of peptide antibiotics in producer organisms. *Nature* 254, 79-82.
- Hakenbeck, R. (1995). Target-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Biochem Pharmacol* 50, 1121-27.
- Hall, R.M. (1997). Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp* 207, 192-202; discussion 202-5.
- Han, H., Yang, Y., Olesen, S.H., Becker, A., Betzi, S., and Schönbrunn, E. (2010). The fungal product terreic acid is a covalent inhibitor of the bacterial cell wall biosynthetic enzyme UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (MurA). *Biochemistry* 49, 4276-282.
- Hancock, R., and Fitz-James, P.C. (1964). Some differences in the action of penicillin, bacitracin, and vancomycin on *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* 87, 1044-050.
- Hancock, R.E., and Chapple, D.S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1317-323.
- Hanover, J.A., and Lennarz, W.J. (1979). The topological orientation of N,N'-diacetylchitobiosylpyrophosphoryldolichol in artificial and natural membranes. *J Biol Chem* 254, 9237-246.
- Harrington, C.R., and Baddiley, J. (1983). Peptidoglycan synthesis by partly autolyzed cells of *Bacillus subtilis* W23. *J Bacteriol* 155, 776-792.
- Harwood, C.R., and Cutting, S.M. (1990). *Molecular biological methods for Bacillus* (Wiley).
- Heaton, M.P., and Neuhaus, F.C. (1994). Role of the D-alanyl carrier protein in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid. *J Bacteriol* 176, 681-690.
- Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* 8, 67-113.

- Higgins, C.F., and Linton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 11, 918-926.
- Hiron, A., Falord, M., Valle, J., Débarbouillé, M., and Msadek, T. (2011). Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. *Mol Microbiol*
- Holmberg, S.D., Wells, J.G., and Cohen, M.L. (1984). Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant *Salmonella*: investigations of U.S. outbreaks, 1971-1983. *Science* 225, 833-35.
- Hong, H.J., Paget, M.S., and Buttner, M.J. (2002). A signal transduction system in *Streptomyces coelicolor* that activates the expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Mol Microbiol* 44, 1199-1211.
- Hopfner, K.P., and Tainer, J.A. (2003). Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. *Curr Opin Struct Biol* 13, 249-255.
- Höltje, J.V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 181-203.
- Hsu, S.T., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M., and van Nuland, N.A. (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat Struct Mol Biol* 11, 963-67.
- Huang, H.W. (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39, 8347-352.
- Huang, X., and Helmann, J.D. (1998). Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* sigma X factor using a consensus-directed search. *J Mol Biol* 279, 165-173.
- Huang, X., Gaballa, A., Cao, M., and Helmann, J.D. (1999). Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factor, sigma W. *Mol Microbiol* 31, 361-371.
- Icho, T., and Raetz, C.R. (1983). Multiple genes for membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli* and their action on phospholipid precursors. *J Bacteriol* 153, 722-730.
- Isono, F., and Inukai, M. (1991). Mureidomycin A, a new inhibitor of bacterial peptidoglycan synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 234-36.
- Jack, D.L., Yang, N.M., and Saier, M.H. (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur J Biochem* 268, 3620-639.
- Jacoby, G.A., and Archer, G.L. (1991). New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med* 324, 601-612.
- Jacoby, G.A., Mills, D.M., and Chow, N. (2004). Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3203-06.
- Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1990). The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for vir gene regulation. *J Bacteriol* 172, 525-530.
- de Jonge, B.L., Kutschke, A., Uria-Nickelsen, M., Kamp, H.D., and Mills, S.D. (2009). Pyrazolopyrimidinediones are selective agents for *Helicobacter pylori* that suppress growth through inhibition of glutamate racemase (MurI). *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3331-36.
- Joseph, P., Fichant, G., Quentin, Y., and Denizot, F. (2002). Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *Bacillus/Clostridium* group, suggest a functional link between them. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4, 503-513.

- Joseph, P., Guiseppi, A., Sorokin, A., and Denizot, F. (2004). Characterization of the *Bacillus subtilis* YxdJ response regulator as the inducer of expression for the cognate ABC transporter YxdLM. *Microbiology* 150, 2609-617.
- Josephine, H.R., Charlier, P., Davies, C., Nicholas, R.A., and Pratt, R.F. (2006). Reactivity of penicillin-binding proteins with peptidoglycan-mimetic beta-lactams: what's wrong with these enzymes? *Biochemistry* 45, 15873-883.
- Jourlin, C., Bengrine, A., Chippaux, M., and Méjean, V. (1996). An unorthodox sensor protein (TorS) mediates the induction of the tor structural genes in response to trimethylamine N-oxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 20, 1297-1306.
- Jung, K., and Altendorf, K. (2002). Towards an understanding of the molecular mechanisms of stimulus perception and signal transduction by the KdpD/KdpE system of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4, 223-28.
- Kanof, N.B. (1970). Bacitracin and tyrothricin. *Med Clin North Am* 54, 1291-93.
- Karimova, G., Dautin, N., and Ladant, D. (2005). Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* 187, 2233-243.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5752-56.
- Kasahara, M., Nakata, A., and Shinagawa, H. (1991). Molecular analysis of the *Salmonella typhimurium* *phoN* gene, which encodes nonspecific acid phosphatase. *J Bacteriol* 173, 6760-65.
- Kato, J., Fujisaki, S., Nakajima, K., Nishimura, Y., Sato, M., and Nakano, A. (1999). The *Escherichia coli* homologue of yeast RER2, a key enzyme of dolichol synthesis, is essential for carrier lipid formation in bacterial cell wall synthesis. *J Bacteriol* 181, 2733-38.
- Kerr, I.D., Reynolds, E.D., and Cove, J.H. (2005). ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport? *Biochem Soc Trans* 33, 1000-02.
- Kikukawa, T., Miyauchi, S., Arais, T., Kamo, N., and Nara, T. (2007). Anti-parallel membrane topology of two components of EbrAB, a multidrug transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 1071-75.
- Kleinkauf, H., and Von Döhren, H. (1996). A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem* 236, 335-351.
- Kobayashi, K., Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Ogasawara, N., Tanaka, T., and Fujita, Y. (2001). Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J Bacteriol* 183, 7365-370.
- Kobayashi, S., Kuzuyama, T., and Seto, H. (2000). Characterization of the *fomA* and *fomB* gene products from *Streptomyces wedmorensis*, which confer fosfomycin resistance on *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 647-650.
- Koch, A.L. (2003). Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clin Microbiol Rev* 16, 673-687.
- Kolar, S.L., Nagarajan, V., Oszmiana, A., Rivera, F.E., Miller, H.K., Davenport, J.E., Riordan, J.T., Potempa, J., Barber, D.S., et al. (2011). NsaRS is a cell-envelope-stress-sensing two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 157, 2206-219.
- Konz, D., and Marahiel, M.A. (1999). How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* 6, R39-R48.
- Konz, D., Doekel, S., and Marahiel, M.A. (1999). Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J Bacteriol* 181, 133-140.

- Korat, B., Mottl, H., and Keck, W. (1991). Penicillin-binding protein 4 of *Escherichia coli*: molecular cloning of the *dacB* gene, controlled overexpression, and alterations in murein composition. *Mol Microbiol* 5, 675-684.
- Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., and Brückner, R. (2006). A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 188, 5797-5805.
- Kramer, N.E., van Hijum, S.A., Knol, J., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2006). Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1753-761.
- Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1486-1513.
- Kunst, F., and Rapoport, G. (1995). Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177, 2403-07.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessi res, P., Bolotin, A., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H., and Hiramatsu, K. (2003). Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 49, 807-821.
- Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta* 1794, 763-68.
- Labischinski, H., and Maidhof, H. (1994). Bacterial peptidoglycan : overview and evolving concepts. *Bacteria Cell Wall*
- Lambert, M.P., and Neuhaus, F.C. (1972). Mechanism of D-cycloserine action: alanine racemase from *Escherichia coli* W. *J Bacteriol* 110, 978-987.
- Lauth, X., von K ckritz-Blickwede, M., McNamara, C.W., Myskowski, S., Zinkernagel, A.S., Beall, B., Ghosh, P., Gallo, R.L., and Nizet, V. (2009). M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J Innate Immun* 1, 202-214.
- Lawrence, P.J., and Strominger, J.L. (1970). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XVI. The reversible fixation of radioactive penicillin G to the D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 245, 3660-66.
- Leaver, M., and Errington, J. (2005). Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 57, 1196-1209.
- Lei, K.J., Shelly, L.L., Pan, C.J., Sidbury, J.B., and Chou, J.Y. (1993). Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* 262, 580-83.
- Li, Q., Sherwood, J.S., and Logue, C.M. (2007). Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. *Lett Appl Microbiol* 44, 86-91.
- Li, X.Z., and Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64, 159-204.
- Lindberg, F., and Normark, S. (1986). Contribution of chromosomal beta-lactamases to beta-lactam resistance in enterobacteria. *Rev Infect Dis* 8 Suppl 3, S292-S304.
- Linden, P.K., and Miller, C.B. (1999). Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33, 113-120.
- Linton, K.J., and Higgins, C.F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* 28, 5-13.

- Liu, P., Mehn, M.P., Yan, F., Zhao, Z., Que, L., and Liu, H.W. (2004). Oxygenase activity in the self-hydroxylation of (s)-2-hydroxypropylphosphonic acid epoxidase involved in fosfomycin biosynthesis. *J Am Chem Soc* 126, 10306-312.
- Liu, P.Q., and Ames, G.F. (1998). In vitro disassembly and reassembly of an ABC transporter, the histidine permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3495-3500.
- Livermore, D.M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8, 557-584.
- Lo, M.C., Helm, J.S., Sarngadharan, G., Pelczar, I., and Walker, S. (2001). A new structure for the substrate-binding antibiotic ramoplanin. *J Am Chem Soc* 123, 8640-41.
- Lohner, K. (2009). New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen Physiol Biophys* 28, 105-116.
- Lohner, K., and Blondelle, S.E. (2005). Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb Chem High Throughput Screen* 8, 241-256.
- Lohner, K., Latal, A., Lehrer, R.I., and Ganz, T. (1997). Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry* 36, 1525-531.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174, 3843-49.
- Lorenz, M.G., and Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58, 563-602.
- Lovering, A.L., de Castro, L.H., Lim, D., and Strynadka, N.C. (2007). Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science* 315, 1402-05.
- Lyon, B.R., and Skurray, R. (1987). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev* 51, 88-134.
- Machaidze, G., and Seelig, J. (2003). Specific binding of cinnamycin (Ro 09-0198) to phosphatidylethanolamine. Comparison between micellar and membrane environments. *Biochemistry* 42, 12570-76.
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., and Dessen, A. (2006). Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 30, 673-691.
- Mainardi, J.L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.E., Dubost, L., Brouard, J.P., Ouazzani, J., Rice, L.B., Gutmann, L., and Arthur, M. (2005). A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *J Biol Chem* 280, 38146-152.
- Majchrzykiewicz, J.A., Kuipers, O.P., and Bijlsma, J.J. (2010). Generic and specific adaptive responses of *Streptococcus pneumoniae* to challenge with three distinct antimicrobial peptides, bacitracin, LL-37, and nisin. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 440-451.
- Manciu, L., Chang, X.B., Buyse, F., Hou, Y.X., Gustot, A., Riordan, J.R., and Ruyschaert, J.M. (2003). Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J Biol Chem* 278, 3347-356.
- Marshall, C.G., Broadhead, G., Leskiw, B.K., and Wright, G.D. (1997). D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6480-83.
- Marshall, C.G., Lessard, I.A., Park, I., and Wright, G.D. (1998). Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 2215-220.
- Martin, N.I., Sprules, T., Carpenter, M.R., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., and Vederas, J.C. (2004). Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry* 43, 3049-056.

- Mascher, T. (2006). Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 264, 133-144.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Unden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 910-938.
- Mascher, T., Margulis, N.G., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D. (2003). Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Mol Microbiol* 50, 1591-1604.
- Mascher, T., Zimmer, S.L., Smith, T.A., and Helmann, J.D. (2004). Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2888-896.
- Massova, I., and Mobashery, S. (1998). Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1-17.
- Matsuo M., Kato F., Oogai Y., Kawai T., Sugai M., & Komatsuzawa H. (2010). J Antimicrob Chemother. In *Distinct two-component systems in methicillin-resistant Staphylococcus aureus can change the susceptibility to antimicrobial agents*.
- Matsuzaki, K. (2001). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defence? *Biochem Soc Trans* 29, 598-601.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Harada, M., Fujii, N., and Miyajima, K. (1997). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1327, 119-130.
- Mattei, P.J., Neves, D., and Dessen, A. (2010). Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis. *Curr Opin Struct Biol* 20, 749-755.
- McCafferty, D.G., Cudic, P., Frankel, B.A., Barkallah, S., Kruger, R.G., and Li, W. (2002). Chemistry and biology of the ramoplanin family of peptide antibiotics. *Biopolymers* 66, 261-284.
- McCallum, N., Spehar, G., Bischoff, M., and Berger-Bächi, B. (2006). Strain dependence of the cell wall-damage induced stimulon in *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* 1760, 1475-481.
- McCloskey, M.A., and Troy, F.A. (1980). Paramagnetic isoprenoid carrier lipids. 2. Dispersion and dynamics in lipid membranes. *Biochemistry* 19, 2061-66.
- McGowan, L.L., Jackson, C.R., Barrett, J.B., Hiott, L.M., and Fedorka-Cray, P.J. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J Food Prot* 69, 2976-982.
- Meehl, M., Herbert, S., Götz, F., and Cheung, A. (2007). Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2679-689.
- Mendoza, D., Schujman, G.E., and Aguilar, P.S. (2002). Biosynthesis and function of membrane lipids. *Bacillus subtilis and its closest relatives*
- Méjean, V., Iobbi-Nivol, C., Lepelletier, M., Giordano, G., Chippaux, M., and Pascal, M.C. (1994). TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the tor operon. *Mol Microbiol* 11, 1169-179.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. 1972. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY , 352-55.
- Ming, L.J., and Epperson, J.D. (2002). Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorg Biochem* 91, 46-58.
- Missiakas, D., and Raina, S. (1998). The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* 28, 1059-066.

- Mohammadi, T., Karczmarek, A., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., and den Blaauwen, T. (2007). The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 65, 1106-121.
- Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Distèche, M., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* 30, 1425-432.
- Mohr, H., and Kleinkauf, H. (1978). Alamethicin biosynthesis: acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. *Biochim Biophys Acta* 526, 375-386.
- Mondy, K.E., Shannon, W., and Mundy, L.M. (2001). Evaluation of zinc bacitracin capsules versus placebo for enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* 33, 473-76.
- Mongodin, E., Finan, J., Climo, M.W., Rosato, A., Gill, S., and Archer, G.L. (2003). Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin. *J Bacteriol* 185, 4638-643.
- Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1997). The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* 179, 6843-850.
- Muñoz, R., Dowson, C.G., Daniels, M., Coffey, T.J., Martin, C., Hakenbeck, R., and Spratt, B.G. (1992). Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 6, 2461-65.
- Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D., and Barras, F. (2003). SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J* 22, 427-437.
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., and Shimonishi, Y. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J Biol Chem* 263, 16709-713.
- Navarro, J., Chabot, J., Sherrill, K., Aneja, R., Zahler, S.A., and Racker, E. (1985). Interaction of duramycin with artificial and natural membranes. *Biochemistry* 24, 4645-650.
- Nes, I.F., and Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55, 50-61.
- Nes, I.F., Diep, D.B., and Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol* 189, 1189-198.
- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 686-723.
- Neumüller, A.M., Konz, D., and Marahiel, M.A. (2001). The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem* 268, 3180-89.
- Nikaido, H., and Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta* 1794, 769-781.
- Normark, S., Lindquist, S., and Lindberg, F. (1986). Chromosomal beta-lactam resistance in enterobacteria. *Scand J Infect Dis Suppl* 49, 38-45.
- Ogawa, C., Kihara, A., Gokoh, M., and Igarashi, Y. (2003). Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *J Biol Chem* 278, 1268-272.

- Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003). The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49, 1135-144.
- Ohki, R., Tateno, K., Okada, Y., Okajima, H., Asai, K., Sadaie, Y., Murata, M., and Aiso, T. (2003). A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J Bacteriol* 185, 51-59.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., and Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251-54.
- Oren, Z., and Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451-463.
- Oren, Z., Lerman, J.C., Gudmundsson, G.H., Agerberth, B., and Shai, Y. (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341 (Pt 3), 501-513.
- Ouyang, J., Tian, X.L., Versey, J., Wishart, A., and Li, Y.H. (2010). The BceABRS four-component system regulates the bacitracin-induced cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 3895-3906.
- Pag, U., and Sahl, H.G. (2002). Multiple activities in lantibiotics--models for the design of novel antibiotics? *Curr Pharm Des* 8, 815-833.
- Pakhomova, S., Bartlett, S.G., Augustus, A., Kuzuyama, T., and Newcomer, M.E. (2008). Crystal structure of fosfomycin resistance kinase FomA from *Streptomyces wedmorensis*. *J Biol Chem* 283, 28518-526.
- Patel, R., Piper, K., Cockerill, F.R., Steckelberg, J.M., and Yousten, A.A. (2000). The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 705-09.
- Payot, S., Cloeckaert, A., and Chaslus-Dancla, E. (2002). Selection and characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Campylobacter jejuni* using enrofloxacin. *Microb Drug Resist* 8, 335-343.
- Pechère, J.C., Hughes, D., Kardas, P., and Cornaglia, G. (2007). Non-compliance with antibiotic therapy for acute community infections: a global survey. *Int J Antimicrob Agents* 29, 245-253.
- Pedersen, L.B., Angert, E.R., and Setlow, P. (1999). Septal localization of penicillin-binding protein 1 in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181, 3201-211.
- Peng, H., and Mariani, K.J. (1993). *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem* 268, 24481-490.
- Perraud, A.L., Weiss, V., and Gross, R. (1999). Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* 7, 115-120.
- Peschel, A., and Sahl, H.G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4, 529-536.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., and Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 274, 8405-410.
- Peters, B.M., Shirliff, M.E., and Jabra-Rizk, M.A. (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog* 6, e1001067.
- Piddock, L.J. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* 58 Suppl 2, 11-18.

- Pietikäinen, M., François, P., Hyöryläinen, H.L., Tangomo, M., Sass, V., Sahl, H.G., Schrenzel, J., and Kontinen, V.P. (2009). Transcriptome analysis of the responses of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial peptides and characterization of the roles of *vraDE* and *vraSR* in antimicrobial resistance. *BMC Genomics* 10, 429.
- Pietikäinen, M., Gardemeister, M., Mecklin, M., Leskelä, S., Sarvas, M., and Kontinen, V.P. (2005). Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology* 151, 1577-592.
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., and Grabnar, M. (2000). The role of the bacitracin ABC transporter in bacitracin resistance and collateral detergent sensitivity. *FEMS Microbiol Lett* 188, 103-06.
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R., and Grabnar, M. (1995). *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* 16, 969-976.
- Popham, D.L., Gilmore, M.E., and Setlow, P. (1999). Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. *J Bacteriol* 181, 126-132.
- Popham, D.L., Illades-Aguir, B., and Setlow, P. (1995). The *Bacillus subtilis* *dacB* gene, encoding penicillin-binding protein 5*, is part of a three-gene operon required for proper spore cortex synthesis and spore core dehydration. *J Bacteriol* 177, 4721-29.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., and Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31, 12416-423.
- Pratt, L.A., and Silhavy, T.J. (1995). Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction. *Mol Microbiol* 17, 565-573.
- Putman M., Van Veen H. W., Degener J. E., & Konings W. N. (2000). *Mol Microbiol*. In Antibiotic resistance: era of the multidrug pump.. ENGLAND: [UNKNOWN REFERENCE TYPE]
- Quentin, Y., and Fichant, G. (2000). ABCdb: an ABC transporter database. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 501-04.
- Quentin, Y., Fichant, G., and Denizot, F. (1999). Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J Mol Biol* 287, 467-484.
- Ra, S.R., Qiao, M., Immonen, T., Pujana, I., and Saris, P.E.J. (1996). Genes responsible for nisin synthesis, regulation and immunity form a regulon of two operons and are induced by nisin in *Lactococcus lactis* N8. *Microbiology* 142, 1281.
- Racker, E., Riegler, C., and Abdel-Ghany, M. (1984). Stimulation of glycolysis by placental polypeptides and inhibition by duramycin. *Cancer Res* 44, 1364-67.
- Ramnath, M., Beukes, M., Tamura, K., and Hastings, J.W. (2000). Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66, 3098-3101.
- Rees, D.C., Johnson, E., and Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 218-227.
- Reynolds, P.E., and Somner, E.A. (1990). Comparison of the target sites and mechanisms of action of glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Drugs Exp Clin Res* 16, 385-89.
- Rice, L.B. (2000). Bacterial monopolists: the bundling and dissemination of antimicrobial resistance genes in gram-positive bacteria. *Clin Infect Dis* 31, 762-69.

- Rice, L.B., and Murray, B.E. (1995). Beta-lactamase-producing enterococci. *Dev Biol Stand* 85, 107-114.
- Rietkötter, E., Hoyer, D., and Mascher, T. (2008). Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 68, 768-785.
- Rife, C.L., Pharris, R.E., Newcomer, M.E., and Armstrong, R.N. (2002). Crystal structure of a genomically encoded fosfomycin resistance protein (FosA) at 1.19 Å resolution by MAD phasing off the L-III edge of TI(+). *J Am Chem Soc* 124, 11001-03.
- Rowe-Magnus, D.A., Guérout, A.M., and Mazel, D. (1999). Super-integrans. *Res Microbiol* 150, 641-651.
- Rukmana, A., Morimoto, T., Takahashi, H., Giyanto, and Ogasawara, N. (2009). Assessment of transcriptional responses of *Bacillus subtilis* cells to the antibiotic enduracidin, which interferes with cell wall synthesis, using a high-density tiling chip. *Genes Genet Syst* 84, 253-267.
- Ruzin, A., Singh, G., Severin, A., Yang, Y., Dushin, R.G., Sutherland, A.G., Minnick, A., Greenstein, M., May, M.K., et al. (2004). Mechanism of action of the mannopeptimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 728-738.
- Sablon, E., Contreras, B., and Vandamme, E. (2000). Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 68, 21-60.
- Sahl, H.G., Jack, R.W., and Bierbaum, G. (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur J Biochem* 230, 827-853.
- Saier, M.H., Yen, M.R., Noto, K., Tamang, D.G., and Elkan, C. (2009). The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Res* 37, D274-78.
- Salyers, A.A., and Shoemaker, N.B. (1996). Resistance gene transfer in anaerobes: new insights, new problems. *Clin Infect Dis* 23 Suppl 1, S36-S43.
- Saurin, W., Köster, W., and Dassa, E. (1994). Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol Microbiol* 12, 993-1004.
- Sauvage, E., Duez, C., Herman, R., Kerff, F., Petrella, S., Anderson, J.W., Adediran, S.A., Pratt, R.F., Frère, J.M., and Charlier, P. (2007). Crystal structure of the *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 4a, and its complex with a peptidoglycan mimetic peptide. *J Mol Biol* 371, 528-539.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32, 234-258.
- Schechter, N., Momose, K., and Rudney, H. (1972). The effect of bacitracin and Ca ++ on the formation of polyprenylpyrophosphates and their incorporation into ubiquinone precursors in mammalian and bacterial systems. *Biochem Biophys Res Commun* 48, 833-39.
- Scheffers, D.J. (2005). Dynamic localization of penicillin-binding proteins during spore development in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 151, 999-1012.
- Scheffers, D.J., and Errington, J. (2004). PBP1 is a component of the *Bacillus subtilis* cell division machinery. *J Bacteriol* 186, 5153-56.
- Scheffers, D.J., and Pinho, M.G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 585-607.
- Schneider, E., and Hunke, S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 22, 1-20.

- Schneider, T., and Sahl, H.G. (2010). An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int J Med Microbiol* 300, 161-69.
- Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A.K., Mygind, P.H., et al. (2010). Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science* 328, 1168-172.
- Sevcsik, E., Pabst, G., Jilek, A., and Lohner, K. (2007). How lipids influence the mode of action of membrane-active peptides. *Biochim Biophys Acta* 1768, 2586-595.
- Shai, Y., and Oren, Z. (2001). From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* 22, 1629-641.
- Shi, Y., Cromie, M.J., Hsu, F.F., Turk, J., and Groisman, E.A. (2004). PhoP-regulated Salmonella resistance to the antimicrobial peptides magainin 2 and polymyxin B. *Mol Microbiol* 53, 229-241.
- Siegers, K., and Entian, K.D. (1995). Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl Environ Microbiol* 61, 1082-89.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Pukło, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., et al. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4673-79.
- Siewert, G., and Strominger, J.L. (1967). Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in the biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 767-773.
- Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* 146 (Pt 2), 249-262.
- Somner, E.A., and Reynolds, P.E. (1990). Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramoplanin. *Antimicrob Agents Chemother* 34, 413-19.
- Sonveaux, N., Vigano, C., Shapiro, A.B., Ling, V., and Ruyschaert, J.M. (1999). Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem* 274, 17649-654.
- Stachelhaus, T., and Marahiel, M.A. (1995). Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J Biol Chem* 270, 6163-69.
- Staroń, A., Finkeisen, D.E., and Mascher, T. (2011). Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 515-525.
- Stein, T., Heinzmann, S., Düsterhus, S., Borchert, S., and Entian, K.D. (2005). Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J Bacteriol* 187, 822-28.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R., and Morris, H.R. (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* 271, 15428-435.
- Stephenson, K., and Hoch, J.A. (2002). Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol Ther* 93, 293-305.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53, 450-490.
- Stone, K.J., and Strominger, J.L. (1971). Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 3223-27.
- Strancar, K., Blanot, D., and Gobec, S. (2006). Design, synthesis and structure-activity relationships of new phosphinate inhibitors of MurD. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 343-48.

- Strancar, K., Boniface, A., Blanot, D., and Gobec, S. (2007). Phosphinate inhibitors of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: L-lysine ligase (MurE). *Arch Pharm (Weinheim)* 340, 127-134.
- Styers, D., Sheehan, D.J., Hogan, P., and Sahm, D.F. (2006). Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5, 2.
- Suárez, J.E., and Mendoza, M.C. (1991). Plasmid-encoded fosfomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 791-95.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40, 722-756.
- Tanaka, H., Oiwa, R., Matsukura, S., and Omura, S. (1979). Amphomycin inhibits phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase in peptidoglycan synthesis of *Bacillus*. *Biochem Biophys Res Commun* 86, 902-08.
- Tatar, L.D., Marolda, C.L., Polischuk, A.N., van Leeuwen, D., and Valvano, M.A. (2007). An *Escherichia coli* undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase implicated in undecaprenyl phosphate recycling. *Microbiology* 153, 2518-529.
- Thackray, P.D., and Moir, A. (2003). SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J Bacteriol* 185, 3491-98.
- Tipper, D.J., and Strominger, J.L. (1968). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XII. Inhibition of cross-linking by penicillins and cephalosporins: studies in *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Biol Chem* 243, 3169-179.
- Tiyanont, K., Doan, T., Lazarus, M.B., Fang, X., Rudner, D.Z., and Walker, S. (2006). Imaging peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis* with fluorescent antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11033-38.
- Todd, J.A., Bone, E.J., and Ellar, D.J. (1985). The sporulation-specific penicillin-binding protein 5a from *Bacillus subtilis* is a DD-carboxypeptidase in vitro. *Biochem J* 230, 825-28.
- Touzé, T., Tran, A.X., Hankins, J.V., Mengin-Lecreulx, D., and Trent, M.S. (2008). Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate. *Mol Microbiol* 67, 264-277.
- Tsuda, H., Yamashita, Y., Shibata, Y., Nakano, Y., and Koga, T. (2002). Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3756-764.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B., and Hill, C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 165-185.
- Tyzack, J.K., Wang, X., Belsham, G.J., and Proud, C.G. (2000). ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* 275, 34131-39.
- Udo, E.E., and Jacob, L.E. (1998). Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance and the mobilization of non-conjugative plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist* 4, 185-193.
- Uhl, M.A., and Miller, J.F. (1996). Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J* 15, 1028-036.
- Urbatsch, I.L., Tyndall, G.A., Tomblin, G., and Senior, A.E. (2003). P-glycoprotein catalytic mechanism: studies of the ADP-vanadate inhibited state. *J Biol Chem* 278, 23171-79.

- Utaida, S., Dunman, P.M., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Singh, V.K., Jayaswal, R.K., and Wilkinson, B.J. (2003). Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology* 149, 2719-732.
- Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Héchard, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J.W., and Rautenbach, M. (2004). Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* 150, 3025-033.
- Vadyvaloo, V., Snoep, J.L., Hastings, J.W., and Rautenbach, M. (2004). Physiological implications of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* 150, 335-340.
- van Dam, V., Sijbrandi, R., Kol, M., Swiezewska, E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2007). Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes. *Mol Microbiol* 64, 1105-114.
- van den Ent, F., Amos, L.A., and Löwe, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* 413, 39-44.
- Van Den Hooven, H.W., Spronk, C.A., Van De Kamp, M., Konings, R.N., Hilbers, C.W., and Van De Van, F.J. (1996). Surface location and orientation of the lantibiotic nisin bound to membrane-mimicking micelles of dodecylphosphocholine and of sodium dodecylsulphate. *Eur J Biochem* 235, 394-403.
- Van Der Heide, T., and Poolman, B. (2002). ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO reports* 3, 938-943.
- van Veen, H.W., Margolles, A., Müller, M., Higgins, C.F., and Konings, W.N. (2000). The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J* 19, 2503-514.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1
- Walker, S., Chen, L., Hu, Y., Rew, Y., Shin, D., and Boger, D.L. (2005). Chemistry and biology of ramoplanin: a lipoglycopeptide with potent antibiotic activity. *Chem Rev* 105, 449-476.
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406, 775-781.
- Ward, J.B. (1973). The chain length of the glycans in bacterial cell walls. *Biochem J* 133, 395-98.
- Waxman, D.J., and Strominger, J.L. (1983). Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem* 52, 825-869.
- Wecke, T., Veith, B., Ehrenreich, A., and Mascher, T. (2006). Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. *J Bacteriol* 188, 7500-511.
- White, C.L., Kitich, A., and Gober, J.W. (2010). Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol Microbiol* 76, 616-633.
- White, S.H., Wimley, W.C., and Selsted, M.E. (1995). Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr Opin Struct Biol* 5, 521-27.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., and Sahl, H.G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* 276, 1772-79.
- Williams, D.H. (1996). The glycopeptide story--how to kill the deadly 'superbugs'. *Nat Prod Rep* 13, 469-477.

- Winn, M., Goss, R.J., Kimura, K., and Bugg, T.D. (2010). Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis. *Nat Prod Rep* 27, 279-304.
- Wolf, D., Kalamorz, F., Wecke, T., Juszczak, A., Mäder, U., Homuth, G., Jordan, S., Kirstein, J., Hoppert, M., et al. (2010). In-depth profiling of the LiaR response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 192, 4680-693.
- Woodyer, R.D., Shao, Z., Thomas, P.M., Kelleher, N.L., Blodgett, J.A., Metcalf, W.W., van der Donk, W.A., and Zhao, H. (2006). Heterologous production of fosfomycin and identification of the minimal biosynthetic gene cluster. *Chem Biol* 13, 1171-182.
- Xu, Q., and West, A.H. (1999). Conservation of structure and function among histidine-containing phosphotransfer (HPt) domains as revealed by the crystal structure of YPD1. *J Mol Biol* 292, 1039-050.
- Yang, L., Weiss, T.M., Lehrer, R.I., and Huang, H.W. (2000). Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J* 79, 2002-09.
- Yang, X., Doherty, G.P., and Lewis, P.J. (2008). Tandem affinity purification vectors for use in gram positive bacteria. *Plasmid* 59, 54-62.
- Yang, Y., Severin, A., Chopra, R., Krishnamurthy, G., Singh, G., Hu, W., Keeney, D., Svenson, K., Petersen, P.J., et al. (2006). 3,5-dioxypyrazolidines, novel inhibitors of UDP-N- acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB) with activity against gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 556-564.
- Yoshida, Y., Matsuo, M., Oogai, Y., Kato, F., Nakamura, N., Sugai, M., and Komatsuzawa, H. (2011). Bacitracin sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 320, 33-39.
- Young, J., and Holland, I.B. (1999). ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim Biophys Acta* 1461, 177-200.
- Ysern, P., Clerch, B., Castaño, M., Gibert, I., Barbé, J., and Llagostera, M. (1990). Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis* 5, 63-66.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32, 361-385.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zawadzke, L.E., Norcia, M., Desbonnet, C.R., Wang, H., Freeman-Cook, K., and Dougherty, T.J. (2008). Identification of an inhibitor of the MurC enzyme, which catalyzes an essential step in the peptidoglycan precursor synthesis pathway. *Assay Drug Dev Technol* 6, 95-103.

Abstract

Signal transduction systems and ABC transporters often contribute jointly to adaptive bacterial responses to environmental changes. In *Bacillus subtilis*, three such pairs, thereafter called modules, are involved in responses to antibiotics: BceRSAB, PsdRSAB and YxdJKLM. They are characterized by a histidine kinase belonging to the Intramembrane Sensing – Histidine Kinase family (IM-HK) and by a Membrane Spanning Domain (MSD) possessing an unusually large extracytoplasmic loop.

Using a phylogenomic approach we were able to demonstrate that such modules, associating a phosphorelay and an ABC transporter, are specific but widespread in Firmicutes where they originated. This analysis highlights a highly dynamic evolutionary history involving numerous horizontal gene transfers, duplications and lost events, leading to a great variety of Bce-like module repertoires in members of this bacterial phylum. Based on fine phylogenetic analyses, the Bce-like modules were divided into six well-defined subfamilies.

Functional studies were performed on some members of subfamily IV comprising the bacitracin resistance module BceRSAB of *B. subtilis*, the expression of which being found to require, in the presence of bacitracin, the signal transduction system as well as the ABC transporter itself. The present results indicate that two other members of subfamily IV, YtsCD of *B. licheniformis* and BceAB of *B. halodurans*, were also found to participate in bacitracin resistance processes. The results also suggest that in these modules the ABC transporter works as the first sensor of the antibiotic and that it then activates the signal transduction system through an interaction between one of the two ABC transporter domains and the module kinase.

Bacitracin dependent expression of *bceAB* and bacitracin resistance processes were shown to require the presence of the BceB translocator loop suggesting a crucial role for this loop as well at a functional level, as at a structural level.

This study suggests that the original BceRSAB module regulatory mechanism might be generalised to other modules and would constitute an important common antibiotic resistance mechanism in Firmicutes, which comprise many human pathogens.

Résumé

Les systèmes de transduction du signal et les transporteurs ABC contribuent de façon conjointe à la réponse adaptative des bactéries aux changements d'environnement. Trois modules, associant un phosphorelais et un transporteur ABC, ont été répertoriés chez *B. subtilis* et sont impliqués dans la réponse à différents antibiotiques: BceRSAB, PsdRSAB et YxdJKLM. Ils sont caractérisés par une histidine kinase possédant une boucle extracytoplasmique courte et appartenant à la famille des Intramembrane Sensing - Histidine Kinase (IM-HK) et par un transporteur ABC possédant une Membrane Spanning Domain (MSD) à boucle extracytoplasmique exceptionnellement longue.

En utilisant une approche phylogénomique, il a été établi que ce type de modules était restreint aux Firmicutes, où ils sont apparus et se sont largement répandus. De plus, cette analyse met en lumière une histoire évolutive très dynamique impliquant de nombreux transferts horizontaux, duplications et pertes de gènes, conduisant à un répertoire de modules Bce-like très varié chez ce phylum. Grâce à une analyse phylogénétique fine, il a été proposé une classification de ces modules en six sous-familles bien définies.

Des études fonctionnelles ont été réalisées sur des membres de la sous-famille IV comprenant le module de résistance à la bacitracine BceRSAB de *B. subtilis*, dont l'expression des gènes codant pour le transporteur requiert, en présence de l'antibiotique, le système de transduction du signal aussi bien que le transporteur lui-même. Les résultats de ces études montrent que d'autres membres de la sous-famille IV, YtsCD de *B. licheniformis* et BceAB de *B. halodurans*, sont également impliqués dans la résistance à la bacitracine. Ils suggèrent aussi que dans ces modules le transporteur ABC est le premier senseur de la présence de l'antibiotique et qu'il active le système de transduction une interaction entre une sous unité du transporteur et la kinase du module.

De plus, en présence de bacitracine, l'expression des gènes codant pour le transporteur BceAB ainsi que la résistance à cet antibiotique requièrent la présence de la boucle de la MSD BceB ce qui démontre l'importance de cette boucle aussi bien au niveau fonctionnel que structural.

Par ailleurs, l'étude que nous avons réalisée suggère que le mécanisme original de régulation des gènes du transporteur BceAB de *B. subtilis* pourrait être généralisé à tous les modules équivalents présents chez les Firmicutes. Ces modules constitueraient ainsi un mécanisme important de résistance aux antibiotiques peptidiques chez les bactéries de ce phylum qui comprend de nombreux pathogènes.